



Title	Saccharomyces cerevisiaeのリン酸取り込みに関与する遺伝子群の解析
Author(s)	文谷, 政憲
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3064555
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Saccharomyces cerevisiae の

リン酸取込みに関与する
遺伝子群の解析

1992年

文 谷 政 憲

Saccharomyces cerevisiae の

リン酸取込みに関与する遺伝子群の解析

1992年

文谷 政憲

目次

緒論	4
----	---

第1章 PH084 遺伝子の構造と発現様式

第1節 緒言	7
第2節 実験材料および実験方法	7
第3節 結果	
第1項 PH084 遺伝子のクローニング	24
第2項 PH084 遺伝子の塩基配列とマッピング	27
第3項 Pho84 タンパク質の構造	32
第4項 PH084 遺伝子破壊の影響	34
第5項 PH084 遺伝子の発現調節	34
第6項 Pho84- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質の細胞内局在性	37
第4節 考察	38
第5節 要約	40

第2章 ヒ酸耐性変異株の分離と性格付け

第1節 緒言	41
第2節 実験材料および実験方法	42
第3節 結果	
第1項 PH084 変異株はヒ酸存在下で生育できる	45
第2項 ヒ酸耐性変異株の分離と遺伝解析	45
第3項 <i>pho86 pho87</i> 変異株の表現型	48
第4項 <i>pho86 pho87</i> 変異株における PH084 遺伝子の発現	48
第5項 <i>pho86 pho87</i> 変異株の rAPase 構成性表現型は PH084 多コピープラスミドにより相補される	52
第6項 PH087 遺伝子のマッピングとクローニング	52
第7項 <i>pho84</i> 変異とホスファターゼ生産調節系遺伝子変異との 二重変異株の表現型	53
第4節 考察	55
第5節 要約	57

第3章 *pho84* 変異株の rAPase 構成性表現型を抑圧する *sef* 変異の 分離と性格付け

第1節 緒言	58
第2節 実験材料および実験方法	58
第3節 結果	
第1項 <i>pho84-1</i> 変異株よりのホスファターゼ生産性が 抑制性となった変異株 (<i>sef</i>) の分離と遺伝解析	59
第2項 <i>sef</i> 変異株の多面表現型	62
第3項 <i>SEF3</i> 遺伝子のクローニングとマッピング	65
第4項 <i>SEF3</i> 遺伝子の塩基配列と転写産物	69
第5項 <i>sef4</i> 変異は <i>PHO81</i> 遺伝子座に起こった変異である	69
第4節 考察	73
第5項 要約	74

第4章 リン酸取り込みに関与する *GTR1* 遺伝子の解析

第1節 緒言	75
第2節 実験材料および実験方法	75
第3節 結果	
第1項 <i>GTR1</i> 遺伝子の塩基配列の決定	77
第2項 <i>GTR1</i> 遺伝子の発現	78
第3項 <i>gtr1</i> 遺伝子破壊株は rAPase 構成性表現型を示す	83
第4項 <i>gtr1</i> 遺伝子破壊株ではリン酸取り込み活性が低下している	85
第4節 考察	92
第5節 要約	94

総合考察	95
------	----

謝辞	99
----	----

参考文献	100
------	-----

関係論文	108
------	-----

緒論

微生物から動植物にいたるまですべての細胞で、膜構造が細胞の機能およびその構造の維持に関して、重要な役目を果たしている。基本的には、膜構造は細胞を外界と区別し、真核生物細胞では細胞内部の仕切として機能している。しかしそれだけではなく、細胞内外の物質変化に対応した代謝制御に重要な働きをしている。たとえば、膜により隔てられた二つの領域間でのイオンや分子の輸送、あるいは膜構成物の構造的変化を通した情報伝達があげられる。一般に生体膜は、脂質とタンパク質分子の非共有結合により構成されている。脂質二重層が膜の基本構造であり、ほとんどの水溶性分子は、この脂質二重層のために透過をさへぎられる。膜の持つ機能のほとんどにタンパク質分子は関与しており、物質透過や情報伝達に関して重要な働きをしている。

生物にとって最も重要なことのひとつとして、環境に応じて効率よく自己を複製することがある。このために、環境変化に対して的確に対応する機構が備えられている。膜を通じて環境の変化を細胞内に伝達し、速やかにしかも適切な対応を行う必要がある。そのための手段として、遺伝子発現の制御がある。特に、微生物では環境の変化に対して遺伝子レベルで対応する場合が多く、その機構の解析がいろいろな系を用いて行われている (Johnston 1987; Hinnebusch 1988; Oshima 1991)。遺伝子発現の調節過程は、環境の変化あるいは代謝系の変化を細胞が検知し、その変化が細胞質、そして核内に伝わり、さらに伝わった信号が、ある遺伝子の発現の ON・OFF を引き起こすと考えられている。現在、それについての解析は主に転写開始機構について行われており、転写開始以前、つまり環境変化の認識とその情報の遺伝子への伝達過程についてはまだかなりの部分が不明である。

Saccharomyces cerevisiae は、真核生物の実験材料として広く用いられている。その理由として、安定な一倍体から容易に二倍体の栄養細胞が得られることや、一世代に要する時間が比較的短いこと、そして多数の個体を一度に取り扱えることから、詳細な遺伝学的研究にきわめて有利であるのに加えて、*E. coli* で発展した分子生物学的手法のほとんどが利用でき、そのうえ相同的組み換えを利用した DNA の染色体への挿入あるいは特定遺伝子の破壊を簡単に行うことができ、遺

伝子の機能を同定する事が容易であることがあげられる。

当研究室では遺伝子発現調節機構の解析を目的として、*S. cerevisiae* の抑制性ホスファターゼ生産調節系をモデルに研究を行っている。*S. cerevisiae* をリン酸飢餓状態で培養を行うと、細胞壁に局在する抑制性酸性ホスファターゼ (rAPase) および液胞内に局在するアルカリ性ホスファターゼが合成され、リン酸取り込み系も誘導される。これまでに rAPase をコードする *PHO5* 遺伝子およびアルカリ性ホスファターゼをコードする *PHO8* 遺伝子の発現を指標として、種々の調節遺伝子の存在が検出され、発現調節系に対する解析が行われてきた。すべてのホスファターゼ系抑制性酵素構造遺伝子の発現には、*PHO4* 遺伝子産物である正の調節因子の働きが必要である。しかし、高リン酸条件下では、*PHO80* と *PHO85* 遺伝子産物である負因子により、正因子の機能は阻害され、構造遺伝子の発現は停止する。培地中のリン酸濃度が十分低い条件では、見かけ上、正に働く仲介因子である *PHO81* 遺伝子産物が負因子活性を阻害し、負因子の阻害から逃れた正因子はその機能を回復する。つまり、環境の変化による信号を認識した仲介因子から負因子を経て正因子により構造遺伝子が発現すると考えられる。この調節系においても、正因子 Pho4 タンパク質とその標的遺伝子との関係はかなり解析が進んできた (Ogawa and Oshima 1990; Hayashi and Oshima 1991)。しかし、環境の変化に起因する信号の初期認識機構や伝達についての解析はなされていない。ホスファターゼ系では、リン酸濃度により制御が行われるため、リン酸そのもの、あるいはその代謝物が細胞内での信号物質として働くと思われる。そこで、本研究では細胞がはじめてリン酸と出会う段階であるリン酸取り込みについて解析を行い、遺伝子発現制御の初期過程を解明することを試みた。

リン酸は生体内では核酸やリン脂質などの生体膜構成成分として、また ATP などエネルギー代謝におけるエネルギー担体、あるいは解糖系などにおけるリン酸化された代謝中間体として重要な役割を担っている。そのため、これまでもリン酸取り込み系についての研究が行われてきた (Cooper 1982; Borst-Pauwels and Peters 1987)。しかしその多くは野生株に対して生化学的手法を用いて研究されたため、複数の系があるリン酸取り込み系では、解析は困難であった。従って、遺伝学的に明確な背景を持つ菌株を用いて研究を行う必要性が指摘されてきた (Cooper 1982)。

当研究室では、すでにリン酸取り込みに関与する遺伝子として、rAPase 構成性表現型を示し、リン酸取り込み活性が低下した *pho84* 変異株を取得していた (Ueda and Oshima 1975)。また、種々の rAPase 生産調節遺伝子変異 (*pho2*, *pho4*, *pho80*, *pho81*, *pho85*) を持つ株を用いてリン酸取り込み活性を調べた結果、リン酸取り込み系には rAPase と同じ制御を受ける系が存在することがわかった (Tamai et al. 1985)。

本研究ではこれらの背景を受けて、*PHO84* 遺伝子を中心として、リン酸取り込みに関与する遺伝子の解析を行った。第1章では、*PHO84* 遺伝子のクローニングおよび分子遺伝学的解析を行い、*PHO84* 遺伝子がリン酸の輸送体をコードすることを明らかにした。第2章ではリン酸のアナログであるヒ酸に対して耐性表現型を示す *pho86 pho87* 二重変異株を取得した。二重変異株におけるリン酸取り込み活性や、*PHO84* 遺伝子の転写量の測定より、*PHO86*, *PHO87* 遺伝子が、*PHO84* 遺伝子産物と協調してリン酸を細胞内に取り込むのに必要なタンパク質をコードする遺伝子であることを明らかにした。また、rAPase 生産調節系遺伝子の変異のうち、酵素非生産性表現型を示す *pho2*, *pho4*, *pho81* 変異と *pho84* 変異との二重変異株がヒ酸耐性表現型を示す事より、*PHO84* 遺伝子と rAPase 生産調節系遺伝子との関係を考察した。第3章では、*pho84* 変異株の rAPase 生産構成性表現型を抑圧する *sef* 変異を分離し解析を行った。その結果、*SEF3* 遺伝子と *SEF6* 遺伝子は細胞増殖と胞子形成に関しても重要な遺伝子である事が示唆された。第4章では、*PHO84* 遺伝子の上流に位置し、GTP 結合タンパク質に対して相同性を示すタンパク質をコードする *GTR1* 遺伝子の解析を行った結果、*GTR1* 遺伝子産物が、*PHO84* 遺伝子産物と協調してリン酸取り込みに関与している可能性を示した。総合考察では、*S. cerevisiae* のリン酸取り込み系を *E. coli* のリン酸取り込み系と比較しながら、*S. cerevisiae* のリン酸取り込み系が外界のリン酸濃度変化を細胞内に伝達するメカニズムを考察した。

第1章 *PHO84* 遺伝子の構造と発現様式

第1節 緒言

S. cerevisiae のリン酸取り込み系には、リン酸に対する親和性の違いにより、少なくとも高低2つの系が関与することがわかっている (Tamai *et al.* 1985)。高親和性の系は、rAPase (EC 3.1.3.2.) の産生を支配する制御系 (Yoshida *et al.* 1989b) と同じ遺伝子システムを通じて、培地中のリン酸濃度により制御されており、この系が作用するには、*PHO84* 遺伝子産物の存在が必要であることがわかっている (Ueda and Oshima 1975; Tamai *et al.* 1985)。野生型株の rAPase 生産を抑制するのに十分な濃度のリン酸が培地中に存在しても、*pho84* 変異株では rAPase が生産される。また、*pho84* 変異株ではリン酸取り込み活性が野生型株に比べて大きく減少することがわかっている (Ueda and Oshima 1975)。これらの結果より、*PHO84* 遺伝子産物はリン酸の輸送体か、あるいは輸送体をコードする遺伝子の発現に対して働く正因子をコードすると考えられていた (Ueda and Oshima 1975)。

本章では、*PHO84* 遺伝子に対する分子遺伝学的解析の結果、1) 塩基配列より推定される *PHO84* 遺伝子にコードされるタンパク質が、種々の糖輸送体と相同性がある、2) *Pho84*- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質が膜画分より回収されることより、*PHO84* 遺伝子がリン酸輸送体そのものをコードすると考察した。

第2節 実験材料および実験方法

供試菌株とプラスミド

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表1に示した。プラスミドの構築とその DNA 調製には大腸菌 JA221 株 (Clarke and Carbon 1978), MV1184 株 (Vieira and Messing 1987) および GM33 株 (*dam*⁻) (Marinus and Morris 1975) を用いた。*S. cerevisiae* の遺伝子バンクは低コピーベクターである YCp50 の *Bam*HI

部位に酵母菌株 GRF88 株の染色体 DNA を *Sau3AI* で部分分解して生じた断片を連結して作成したもの (Rose *et al.* 1987) を ATCC [American Type Culture Collection (Rockville, Md.)] より購入した。一本鎖DNA調製用のプラスミドとして pUC118 および pUC119 を用いた。酵母の低コピープラスミドとして YCp50 および pTI15 (Wickner 1987) を用い、染色体組み込み用プラスミドとして YIp5 (Parent *et al.* 1985) を用いた。*HIS3* 遺伝子は YIp1 (Parent *et al.* 1985) より切り出した。*PHO84-lacZ* 融合遺伝子を用いた *PHO84* 遺伝子の発現を調べる際の対照用として、*HIS5-lacZ* 融合遺伝子を持つ pSH530 (Nishiwaki *et al.* 1987)を用いた。*ACT1* 遺伝子は pYA301 より調製した (Gallwitz and Sures 1980)。その他のプラスミドについては図1に示した。

Table 1. *S. cerevisiae* strains used

Strain	Genotype ^a	Source
P-28-24C	<i>MATa pho3-1</i>	Our stock
AX49-4B	<i>MATα pho3-1 his4</i>	Our stock
NS216	<i>MATa pho3-1 leu2-3,112 trp1 ura3-52 pho84-1</i>	Our stock
NS219	<i>MATa pho3-1 leu2-3,112 ura3-52 pho84-1</i>	Our stock
MB137	<i>MATα leu2 pho84-1</i>	Our stock
MB159	<i>MATa pho3-1 [PHO84 URA3] pho84-1 leu2-3,112 trp1 ura3-52</i>	This study
MB191	<i>MATa pho3-1 Δade2 leu2-3,112 his3-532 trp1-289 ura3-1,2 can1</i>	This study
MB192 ^b	<i>MATa pho3-1 Δpho84::HIS3 ade2 leu2-3,112 his3-532 trp1-289 ura3-1,2 can1</i>	This study
NBD2-1 ^c	<i>MATa pho3-1 Δpho2::HIS3 ade2 leu2-3,112 his3-532 trp1-289 ura3-1,2 can1</i>	Our stock
NBD4-1	<i>MATa pho3-1 Δpho4::HIS3 ade2 leu2-3,112 his3-532 trp1-289 ura3-1,2 can1</i>	Our stock

NBD80-1 ^d	<i>MATa pho3-1 Δ pho80::HIS3 ade2 leu2-3,112 his3-532 trp1-289 ura3-1,2 can1</i>	Our stock
NBD81-6D ^e	<i>MATa pho3-1 Δ pho81::HIS3 ade2 leu2-3,112 his3-532 trp1-289 ura3-1,2 can1</i>	Our stock
NBW5	<i>MATα ade2 leu2-3,112 his3-532 trp1-289 ura3-1,2 can1</i>	Our stock
NBW78	<i>MATa/MATα pho3-1/pho3-1 ade2/ade2 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-532/his3-532 trp1-289/trp1-289 ura3-1,2/ura3-1,2 can1/can1</i>	Our stock
YAT965	<i>MATa pho3-1 pho85-1 leu2 his4</i>	Our stock
MT8-1	<i>MATa ade his3 leu2 trp1 ura3 gal80::LEU2</i>	T. Fukasawa
DKD-5D	<i>MATa his3 leu2-3,112 trp1</i>	Our stock

^a The genetic symbols used are as described by Mortimer *et al.* (1989).

^b Strain MB192, a *pho84* null mutant, is a haploid segregant from the diploid strain MB183 with an integrated 5.4-kb *Bam*HI-*Eco*RI fragment of pMB123 (Fig. 1).

^c Strain NBD2-1, a *pho2* null mutant, was constructed from strain NBW7 by gene replacement of the 1.2-kb *Eco*RI segment of the *PHO2* (*i.e.*, *GRF10*) gene open reading frame (Yoshida *et al.* 1989a) by the 1.4-kb *Bam*HI-*Xho*I *HIS3* DNA fragment of *S. cerevisiae* derived from YIpl.

^d Strain NBD80-1, a *pho80* null mutant, was constructed from strain NBW7 by gene replacement of the 0.5-kb *Bcl*II-*Hinc*II segment of the *PHO80* gene (Toh-e and Shimauchi 1986) by the 1.4-kb *Bam*HI-*Xho*I *HIS3* DNA fragment of *S. cerevisiae*.

^e Strain NBD81-6D, a *pho81* null mutant, was a haploid segregant of the diploid strain NBD81 constructed by the replacement of the 1.3-kb *Bam*HI-*Sma*I segment of the *PHO81* gene (Yoshida *et al.* 1989a) by the 1.4-kb *Bam*HI-*Xho*I *HIS3* DNA fragment of *S. cerevisiae*.

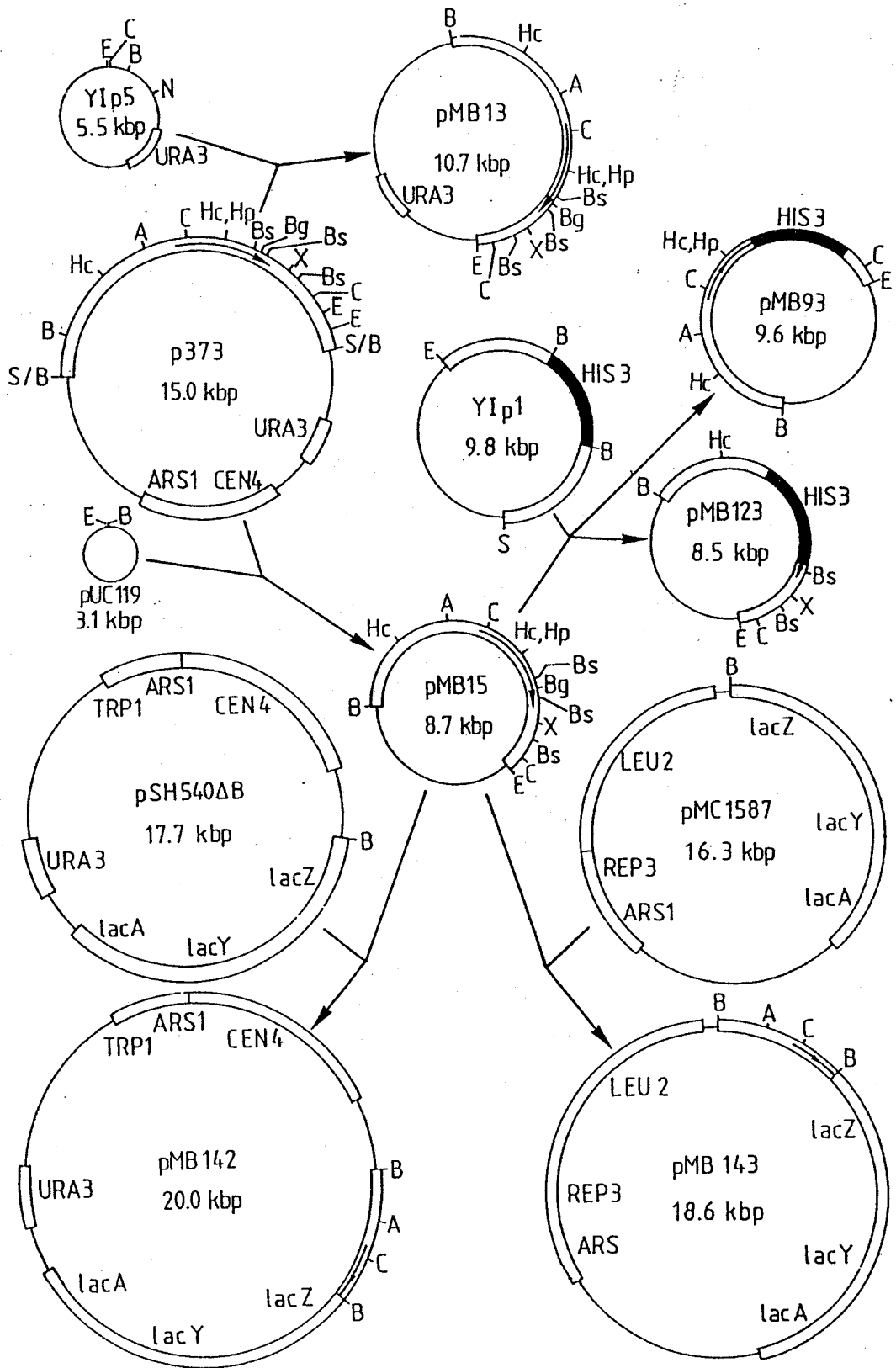


Fig. 1. Structures and constructions of plasmids. The procedures for constructions of p373 and pMB13 are described in the text. pMB15 was constructed by ligation of a 5.6-kb BamHI-EcoRI fragment of PHO84 DNA prepared from p373 to the BamHI-EcoRI gap of pUC119. pMB93 was constructed by ligating a 7.8-kb BstEII fragment of pMB15, after filling in with Klenow fragment, with a 1.7-kb BamHI fragment containing the *S. cerevisiae* HIS3 sequence of YIp1, with filling in of the two ends. pMB123 was constructed by inserting the 1.7-kb BamHI fragment of the HIS3 gene into the BglII site of pMB15 after elimination of a 2.0-kb ApaI-BglII region and was connected with an 8-bp BglII linker (Takara Shuzo Co., Kyoto, Japan) at the ApaI end after digesting the overhanging 3' end to generate a blunt end with T4 DNA polymerase. pMB142 was constructed by inserting a 2.3-kb HincII fragment of PHO84 DNA, prepared from pMB15 and connected with a 10-bp BamHI linker, at the BamHI site of pSH540ΔB previously constructed in this laboratory for analysis of the HIS5 promoter (Nishiwaki et al. 1987). pMB143 was constructed by inserting the same 2.3-kb HincII fragment into the BamHI site of pMC1587 (Casadaban et al. 1983). The restriction sites on the plasmid DNAs are indicated only in the cloned PHO84 fragment. Abbreviations of restriction sites: A, ApaI; B, BamHI; Bg, BglII; Bs, BstEII; C, ClaI; E, EcoRI; Hc, HincII; Hp, HpaI; N, NruI; S, Sau3AI; and X, XhoI. S/B is the junction site of Sau3AI and BamHI.

使用培地と培養方法

酵母の栄養培地には YPAD 培地 [1 liter 当たり Yeast Extract (Difco Laboratories, Detroit, Mich., U.S.A.) 10 g、ポリペプトン (大五栄養) 20 g、アデニン (和光純薬株式会社) 400 mg、グルコース 20 g] を用いた。酵母用最少

培地 (SD) は 1 liter 当たりグルコース 20 g と Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco) 6.7 g を含み、必要に応じてアミノ酸および核酸塩基 [トリプトファン, ヒスチジン, アルギニン, メチオニン, ウラシル (最終濃度 各 20 mg/l)、チロシン, ロイシン, イソロイシン, リジン (最終濃度 各 30 mg/l)、バリン (150 mg/l)、フェニルアラニン (60 mg/ml) および アデニン (400 mg/l)] を加えた。YPAGly 培地および SGly 培地は、それぞれ YPAD 培地および SD 培地のグルコースの代わりに 30 g のグリセロール (和光純薬) を加えたものを用いた。高リン酸最少培地は 1 liter 当たりグルコース 20 g、アスパラギン 2 g、ビタミン混合液 [ピリドキシン, ニコチン酸, チアミン, パントテン酸 (各 200 mg/l)、イノシトール (10 g/l)、ビオチン (20 mg/l)] 1 ml、高リン酸混合液 [KH_2PO_4 (6 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.32 g/l), KI (0.4 mg/l), B, Cu, Mn, Mo, (各 0.04 mg 相当量/l), Fe (0.2 mg 相当量/l), Zn (0.28 mg 相当量/l)] 250 ml を含む。低リン酸最少培地は、1 liter 当たりグルコース 20 g、アスパラギン 2 g、ビタミン混合液 1 ml、低リン酸混合液 [高リン酸混合液における KH_2PO_4 の代わりに、KCl (6 g/l) を含む] 250 ml、高リン酸混合液 5 ml を含む。必要に応じて上記濃度のアミノ酸および核酸塩基を加えた。低リン酸完全培地は Rubin の方法 (1974) を一部改変して次のようにして調製した。Bacto-yeast extract (Difco) 10 g, Bacto-peptone (Difco) 20 g を蒸留水 1 liter に溶かし、1 M MgSO_4 10 ml, アンモニア水 10 ml を順に加えてよく攪はんし、室温で 30 分以上放置する。生じた沈澱を Whatman No.1 濾紙で除き、濃塩酸で濾液の pH を 5.8 に合わせる。グルコース 20 g とアデニン 0.4 g を加え滅菌する。孢子形成用培地としては、1 liter 当たり酢酸カリウム 5 g を含む寒天培地を用いた。

大腸菌の完全培地として通常は改変 Luria-Bertani 培地 [LB 培地; 1 liter 当たり Bactotryptone (Difco) 10 g, Yeast Extract (Difco) 5 g, NaCl 5 g (pH 7.0)] を、MV1184 株に対しては 2 x YT 培地 [1 liter 当たり Bactotryptone (Difco) 16 g, Yeast Extract 10 g, NaCl 5 g] を用いた。大腸菌の最少培地として用いた M9 培地は 1 liter 当たり Na_2HPO_4 6 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0.5 g, NH_4Cl 1 g を含む溶液を滅菌後、別に滅菌した 10 ml の 20% (w/v) グルコース、1 ml の 1 M Mg_2SO_4 および 1 ml の 0.1 M CaCl_2 を加えたものである。ビタミン B₁ (Nacalai Tesque) は最終濃度 1 mg/l、カザミノ酸 5 g/l、およびトリプトフ

アン 40 mg/l を必要に応じて加えた。M13 ファージのブランク形成用平板培地として B 培地 [1 liter 当たり、Bactotryptone 10g, NaCl 8 g, ビタミン B₁ 10 mg] を用い、下層には寒天 20 g、上層には寒天 6 g を加えた。また必要に応じてアンピシリン（明治製菓株式会社）50 μ g/ml、テトラサイクリン（Sigma Chemical Company, St Louise, USA）10 μ g/ml、クロラムフェニコール（和光）100 μ g/ml、5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside (X-gal; 和光) 40 μ g/ml および isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; Nacalai Tesques) 0.3 mM を加えた。平板培地を調製するときは、断わらない限り 1 liter 当たり酵母用には 20 g、大腸菌用には 15 g の寒天を加えた。殺菌は 1 kg/cm² 圧力下 15 分間加熱条件でオートクレーブ滅菌した。酵母は 30°C で、大腸菌は 37°C で静置培養または振とう培養を行った。

遺伝学および分子遺伝学的方法

子囊解剖 孢子形成用培地に移して 2~3 日間培養した子囊を、カタツムリの消化液 (Sucd'helix pomatia; L'Industrie Biologique Franaise, France) により子囊壁を消化処理して行った。このときに用いた寒天フィルムは、1 liter あたり 23 g の寒天を含む YPAD 培地を用いた。

大腸菌の形質転換 Morrison の方法 (1977) に従った。LB 培地で 37°C 一晚培養した培養液 10 ml を 1 liter の LB 培地に植菌し、600 nm における吸光度 (OD₆₀₀) が 0.5~0.6 になるまで振とう培養を行った。培養液を氷中で冷却し 0°C で集菌 (8,000 rpm, 5分; 久保田 Model KR-200A, RA-6ローター) し、菌体を 250 ml の 0.1 M MgCl₂ 水溶液で洗浄後、250 ml の 0.1 M CaCl₂ 水溶液に懸濁し氷中に 20 分放置した。0°C で集菌した後、菌体を 42.5 ml の 0.1 M CaCl₂ と 7.5 ml のグリセロール混合液に懸濁し、コンピテント細胞とした。このコンピテント細胞は、-80°C で数カ月保存可能である。菌体懸濁液 0.2 ml に DNA 溶液 (0.1~1 μ g) を加え、氷中で 30 分間放置後、37°C で 5 分間加熱した。1 ml の LB 培地を加え、37°C で 60 分間静置培養の後、適当量を選択培地に塗布した。

M13 ファージ mp 系プラスミド DNA による大腸菌の感染形質導入 Messing の方法 (1983) に従った。先の大腸菌の形質転換法と同様の方法で調製した JM103 のコンピテント細胞懸濁液 0.2 ml に 0.1~1 μ g のプラスミド DNA を加え、氷

中で 30 分間放置した後、42°C で 2 分間加熱した。この液に融解した 3 ml の上層寒天培地、0.2 ml の対数増殖期大腸菌 JM103 株の培養液、50 μ l の 2% (w/v) X-gal を含むジメチルホルムアミド溶液、10 μ l の 0.1 M IPTG を混合後、下層平板培地に重層した。これを 37°C で一晚培養を行いブランクを形成させた。

酵母の形質転換 酢酸リチウム法 (Ito *et al.* 1983) で行った。酵母を 50 ml YPAD 培地で対数増殖期まで振とう培養後、菌体を回収 (8,000 rpm、5分; 久保田 Model KR-200A、RA-6ローター) した。菌体を TE 緩衝液 [10 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸緩衝液 (Tris-HCl, pH 8.0)、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA, pH 8.0)] で 2 回洗浄後、5 ml の LA 溶液 [0.1 M 酢酸リチウム (和光)を含む TE 緩衝液] に懸濁して、さらに、30°C で 1 時間振とう培養を行った。集菌し、菌体を 5 ml の LAG 溶液 [15% (v/v) グリセロールを含む LA 溶液] に懸濁して受容菌とした。0.3 ml の受容菌と 1~10 μ g の DNA と 0.7 ml の PEG 水溶液 [50% (w/v) ポリエチレングリコール 4,000 (和光)] とを混合して 30°C で 1 時間放置後、このうちの適当量を選択培地に塗布した。

生化学的方法

核酸の精製 核酸を含む溶液に最終濃度 0.3 M 酢酸ナトリウムを加え、さらに 2 倍容量の 99% エタノールを加えて混合し、-20°C・20分 または -80°C・10 分冷却し、沈澱を形成させた。遠心分離 (12,000 rpm 5分; Tomy MC15A Microfuge または 10,000rpm 15分; 久保田 Model KR-200A RA-3ローター) し、核酸の沈澱を回収した。沈澱を 99% エタノールで洗浄した後、減圧下で乾固させた。核酸を含む溶液からタンパク質を除去するには、TE 緩衝液 (pH 8.0) で飽和させたフェノールを等容量加えてよく混合した後、遠心分離 (12,000 rpm 5分; Tomy MC15A Microfuge または 10,000 rpm 15分; 久保田 Model KR-200A RA-3 ローター) を行った。界面のタンパク層を残して上層 (水相) を回収した。場合に応じて、フェノールの代わりにフェノール・クロロホルム (1:1) 混合液を用いた。また、同様に、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) 混合液も用いた。

プラスミド DNA の大量調製 プラスミド DNA の大量調製は大腸菌宿主を用いて、Clewell と Helinski の方法 [CsCl-エチジウムブロマイド (EB) 平衡密度勾

配遠心分離法] (1969) で行った。抗生物質を含む LB 培地で 37°C 一晚振とう培養後、5 ml の培養液をカザミノ酸 5 g/l、トリプトファン 20 mg/l を含む M9 培地 150 ml に植菌して振とう培養を行い、培養液の OD₆₀₀ が 0.8 に達したときに、最終濃度が 100 mg/l となるようにクロラムフェニコール (和光) を添加し、さらに 16 時間培養を続けた。4°C で集菌 (8,000 rpm 5分; 久保田 Model KR-200A、RA-6ローター) 後、25% (w/v) スクロースを含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 2 ml に懸濁した。同緩衝液に 10 mg/ml の濃度で溶かしたリゾチーム (Sigma) 溶液 0.2 ml と、0.5 M EDTA (pH 8.0) 溶液 0.2 ml を加えて混合した後、氷上で 15 分間放置した。これを 62.5 mM EDTA、2% (v/v) Triton X-100 (和光) を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 2.0 ml を加えて溶菌させた後、0°C で遠心分離 (27,000 rpm、90分; 日立 Model 55P-7、RT65T ローター) し上澄液を得た。上澄液 4.5 ml に対し、CsCl 4.55 g、0.5 ml の 5 mg/ml EB (Sigma) 水溶液を加え、分離用遠心管 (5PA シールチューブ; 日立計測器サービス) に CsCl 溶液を移してシールした後、18°C で遠心分離 (50,000 rpm、12時間; 日立 Model 55P-7、RPV65T ローター) を行った。遠心分離後、形成されたプラスミド DNA 層を注射器 (テルモシリンジ; テルモ株式会社) により抜き取り、Corex 遠心管に移した。得られた DNA 試料に対して 2 倍容の水を加えてエタノール沈澱を 2 回繰り返す、2 回のフェノール抽出で不純物を除去し、さらに 2 回のエタノール沈澱を行った。DNA の沈澱を約 400 μ l の TE 緩衝液に溶解し、OD₂₆₀ 値を測定した後、DNA 試料として種々の操作に用いた。

大腸菌からのプラスミド DNA の迅速調製 少量のプラスミド DNA を簡便に調製するために、Birnboim と Doly によるアルカリ変性法 (1979) を用いた。抗生物質を含む LB 培地で一晚培養した大腸菌菌体をエッペンドルフ遠心管に取り、2 mg/ml リゾチーム (Sigma) を含む 0.1 ml の第 I 液 [50 mM グルコース、10 mM EDTA、25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)] に懸濁した。室温に 5 分放置後、0.2 ml の第 II 液 [0.2 N NaOH、1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS; 和光)] を加え、氷上で 5 分間放置して溶菌させた。0.15 ml の第 III 液 [3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8)] を加えて攪拌し、15 分間氷中に放置した後、遠心分離 (12,000 rpm、5分; Microfuge MC15A) を行い、核酸を含む上澄を別のエッペンドルフ遠心管に移した。エタノール沈澱を行い、沈澱を 20 μ g/ml RNaseA (Shigma) を含む

TE 緩衝液 50 μ l に溶解し、DNA 試料として種々の操作に使用した。

単鎖 DNA の調製 Messing の方法 (1983) に従った。2 x YT 培地に指示菌 JM103 株を植菌後、37°C でゆっくり振とう培養し、 $OD_{600} = 0.3$ の頃に M13 ファージ粒子液を M.O.I. (ファージ粒子数/指示菌数) = 1~10 になるように加えた。さらに 4~5 時間培養後、培養液を遠心分離 (8,000 rpm, 5分, 0°C) を行った。菌体からは前述の大量または迅速調製法により、replicative form (RF) DNA を調製し、ファージ粒子を含む上澄液からは、以下の方法で一本鎖 DNA を調製した。上澄液 150 ml に対して、27% (w/v) PEG 6,000 (和光) を含む 3.3 M 塩化ナトリウム溶液 20 ml を加え、4°C で 1 時間以上放置し、ファージ粒子を沈澱させた。遠心分離 (10,000 rpm, 10分, 4°C) により上澄液をよく除いた後、TE 緩衝液にファージ粒子を懸濁し、フェノールおよびフェノール・クロロホルム抽出によりファージタンパクを除去した。得られた DNA 溶液に対してエタノール沈澱を行い、沈澱 DNA を適量の TE 緩衝液に溶解して単鎖 DNA 試料とした。

酵母染色体 DNA の調製 Hereford らの方法 (1979) に従った。8 ml YPAD 培地で停止期まで増殖させた酵母菌体を集菌し、エッペンドルフ遠心管に移した。0.2 M Tris 水溶液で洗浄後、同溶液 0.5 ml に懸濁し、25 μ l の β -mercaptoethanol (Nacalai Tesque) を加えて、25°C で 30 分放置した。集菌 (3,000 rpm, 5分) し、菌体を 0.125 μ g/ml Zymolyase 100T (生化学工業) および 1.0 M ソルビトール (和光) を含む 0.4 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) 0.5 ml に懸濁し、30°C で 1 時間反応させてスフェロプラスト化させた。集菌 (3,000 rpm, 5分) し、菌体を 0.5 ml の溶菌用緩衝液 [0.2 M NaCl, 0.1 M EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)] に懸濁し、30 μ l の 10 mg/ml アクチナーゼ E (和研薬株式会社) 溶液を加え、60°C で 1 時間保温して溶菌させた。溶菌液をフェノール・クロロホルムで 2 回以上抽出した後、エタノール沈澱を行い核酸沈澱を得た。これを 300 μ l の TE 緩衝液に溶解し、1 mg/ml RNase A を含む 10 mM 酢酸ナトリウム溶液 30 μ l 加えて 37°C 30 分反応させた後、さらに、アクチナーゼ E 溶液 30 μ l 加えて 37°C で 30 分反応させた。反応試料をフェノール・クロロホルムで 2 回抽出し、エタノール沈澱を行い、得られた DNA 沈澱を適量の TE 緩衝液に溶解して、染色体 DNA 試料とした。

酵母 RNA の調製 Jensen らの方法 (1983) に従った。200 ml の適当な培地

(例えば高リン酸最少培地)に、酵母細胞を OD_{660} が 0.1 になるように植菌して 30°C で振とう培養を行い、 $OD_{660} = 0.8$ まで増殖したところ(対数増殖後期)に、最終濃度が $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ となるようにシクロヘキシミド (Sigma) を加え、さらに 10 分間培養後集菌した。10 ml の滅菌水で菌体を洗浄後、2 ml の破碎用緩衝液 [0.5 M NaCl , 1% (w/v) SDS, 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.01 M EDTA] に懸濁し、シリコン化した Corex 遠心管に移した。4 g のガラスビーズ (フジストン No. 006; $\phi 0.25\sim 0.3\text{ mm}$, 富士理科工業)、および 2 ml のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール混合液 [25:24:1, TE 緩衝液飽和] を加え、Vortex ミキサー (Scientific Industries, Vortex Genie, N.Y.) で 2 分 30 秒間激しく振とうした。3 ml の破碎用緩衝液と 3 ml のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール混合液とを加えて混合して、遠心分離 ($10,000\text{ rpm}$, 5分; 久保田 Model KR-200A RA-3 ローター) し、上層を別の Corex 遠心管に移した。さらに、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出を繰り返し、 0.05% (v/v) di-ethylpyrocarbonate (DEPC; Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wis.) を含む 99% エタノールを 2 倍容量加えて核酸を沈澱させ、得られた核酸沈澱を酵母全 RNA 試料とした。

酵素反応 制限酵素は宝酒造(株)、東洋紡(株)またはニッポンジーン(株)から購入した。制限酵素 *SalI*, *BamHI* および *XhoI* の反応は、高塩濃度緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl , 10 mM MgCl_2 , $1\text{ mM dithiothreitol}$ (DTT; Sigma)] 中で行った。その他の制限酵素反応は、TA 緩衝液 [33 mM Tris-HCl (pH 7.9), 66 mM 酢酸カリウム , 10 mM 酢酸マグネシウム , 0.5 mM DTT , $100\text{ }\mu\text{g/ml bovin serum albumin}$ (BSA; Sigma)] 中で行った。断わらない限り、いずれも 37°C で 1 時間以上反応させた。T4 DNA リガーゼ (宝酒造) の反応は、約 $1\text{ }\mu\text{g}$ の DNA を含む結合反応緩衝液 [66 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM ATP , 1 mM spermidine (Sigma), 0.01 M MgCl_2 , 15 mM DTT , 0.2 mg/ml BSA] 中で 10 単位の T4 DNA リガーゼを加え、 16°C で 6 時間以上反応させた。Klenow fragment による制限酵素切断末端の平滑化は、約 $1\text{ }\mu\text{g}$ DNA を含む反応液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 10 mM MgSO_4 , 0.1 mM DTT , $50\text{ }\mu\text{g/ml BSA}$, $20\text{ }\mu\text{M dNTP}$ (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)] 中で、1 単位の Klenow fragment (宝酒造) を加えて、 30°C 15 分間反応させた。ホスファターゼによる DNA の 5' 末端リン酸

基の切断反応は、約 1 μ g DNA を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液中で、1 単位の alkaline phosphatase (calf intestine 由来, CIP; Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, W. Germany) を加え、37°C 1 時間反応させた。反応停止にはフェノール・クロロホルム抽出を行った。

電気泳動 アガロースゲル電気泳動は Tanaka らの方法 (1975) に従い、3 mm 厚の 0.7~2% (w/v) アガロース [Agarose L03 (宝酒造)] サブマリン型スラブゲルを使用し、10 倍濃度の泳動用緩衝液 [0.4 M Tris-酢酸緩衝液 (pH 7.4), 0.2 M 酢酸ナトリウム, 10 mM EDTA] を使用前に希釈して用いた。試料は通常、DNA 溶液に 1/5 容量の泳動用染色液 [60% (w/v) スクロース, 10 mM EDTA, 0.25% (w/v) プロモフェノールブルー (BPB)] を加えて調製した。泳動は定電圧 (10 V/cm 以下) で行った。泳動後、ゲルを EB 水溶液 (5 μ g/ml) で染色し、トランスイルミネーター (Ultra Violet C62) で DNA バンドを観察した。写真は UV フィルター (Kenko SL-39) および赤色フィルター (Kenko R-60) を用い、ポラロイドカメラ (MP-4) でフォトラマ PB300 フィルム [富士フィルム(株)] によって撮影した。DNA 断片の分子量は、 λ ci857S7 ファージ DNA (宝酒造) を *Hind*III で切断して得られる断片 (23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0 および 0.6 kb) を標準として推定した。

ポリアクリル電気泳動は Maniatis らの方法 (1975) に従い、4・6・8% (w/v) のポリアクリルアミドスラブゲル (縦型) を使用した。適量の 30% (w/v) アクリルアミド混合液 [アクリルアミド-メチレンビスアクリルアミド 30 : 0.8% (w/v)]、10 ml の 10 x TBE 緩衝液 [890 mM Tris, 890 mM ホウ酸, 25 mM EDTA] および 20 mg/ml の過硫酸アンモニウム水溶液 5 ml に脱イオン水を加え、全量を 100 ml とした。この混合液を減圧下で脱気し、100 μ l の N-N'-N'-tetramethylethylene-diamine (TEMED; Nacalai Tesque) を加え、ゲルを重合させた。試料は、DNA 溶液に 1/5 容量のポリアクリルアミドゲル電気泳動用染色液 [40% (w/v) スクロース, 10 mM EDTA, 0.25% (w/v) BPB, 0.25% (w/v) キシレンシアノール (XC)] を加えて調製した。15 分程度の予備泳動後、核酸試料の泳動を定電圧 (5 V/cm 以下) で行った。泳動後の操作はアガロースゲル電気泳動の場合と同様に行った。DNA 断片の分子量は、pBR322 の *Hpa*II 切断断片を標準として推定した。

ホルマリンアガロース変性ゲル電気泳動は Kaneko らの方法 (1982) を以下のように改変した。脱イオン水 74 ml に、アガロース 1.5 g, 10 x 泳動用緩衝液 [200 mM 3-(N-morpholic) propanesulfonic acid (MOPS) 緩衝液 (pH 7.0), 50 mM 酢酸ナトリウム, 10 mM EDTA, 0.05% (v/v) DEPC] 10 ml を加え、加熱してゲルを融解後、16 ml のホルマリン (和光) を加えて混合し、3 mm 厚のサブマリン型泳動ゲルを作成した。5~20 μ g の poly(A)⁺ RNA を含む溶液 4.5 μ l, 10 x 泳動用緩衝液 1 μ l, 脱イオン化ホルムアミド (和光) 3.5 μ l, ホルマリン 10 μ l を混合し、65°C 5 分加熱後、氷上で急冷した。泳動用染色液 [50% (v/v) グリセロール, 1 mM EDTA, 0.4% (w/v) BPB, 0.4% (w/v) XC] 2 μ l を加え、5 V/cm 以下で泳動を行った。泳動後、rRNA (18S, 25S) のバンドを EB 染色で検出する場合、ゲルを 0.1 M 酢酸アンモニウム溶液に一晩浸した後、EB 溶液 (5 μ g/ml) で染色した。

尿素ポリアルリルアミド変性ゲル電気泳動に使用した 6% (あるいは8%) ポリアルリルアミド溶液は、アクリルアミド 5.7 g (7.6 g)、メチレンビスアクリルアミド 0.3 g (0.4 g)、尿素 50 g, 10 x TBE 緩衝液 10 ml をそれぞれ混合したものに脱イオン水を加え、全量を 100 ml とした。この溶液をグラスフィルター (Glass Micro-fibre Filters; Whatman, UK) で濾過し、脱気した後、10% (w/v) 過硫酸アンモニウム溶液を 1 ml および 30~50 μ l の TEMED を加えて重合させた。なお、泳動用ガラス板は、200 x 400 x 0.35 mm (宝酒造) の大きさのものをを用い、泳動は、30 分程度の予備泳動後、温度 (約 65 °C) を保つように定電圧 (1,500~2,500 V) または定電力 (約 46 W) で行った。泳動後、ゲルを濾紙 (type 3MM; Whatman) に移し、ゲルの反面をサランラップ (旭化成) で被い、ゲルドライヤー (アトー) で 75~80 °C 30 分以上乾燥させた。X線フィルム (Kodak XOMat RP; Estman Kodak Company, N.Y., USA または RXO-H; 富士フィルム) を用いて -80 °C でオートラジオグラフィーを行い、現像と定着はX線フィルムプロセッサ (Model FPM60; 富士写真フィルム) を使用した。現像後、フィルムのスポットから泳動パターンを判断した。

電気泳動ゲルからの DNA 断片の抽出 アガロースゲル (Agarose L03; 宝酒造) からの抽出は、Prep-A-Gene™ DNA Purification Kit (Bio-Rad laboratories, Richmond, CA) を用いて行った。目的とする DNA バンドを含むゲル断片をエッペ

ンドルフ遠心管に取り、その 3 倍量の Prep-A-Gene binding buffer を加えて、37-55 °C の湯浴中で融解させた。これに Prep-A-Gene matrix を DNA 1 μ g あたり 5 μ g 加えてかくはんしたのち、室温で 5-10 分放置した。遠心分離により上澄を除去し沈澱の 50 倍量の binding buffer で洗浄した。さらに、沈澱の 50 倍量の洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。沈澱をその体積とほぼ同量の溶出液に懸濁し、37-50 °C の湯浴中で 5 分間放置した後、遠心分離して得られた上澄液を DNA 溶液とした。ポリアクリルアミドゲルからの抽出は、目的とする DNA バンドを含むゲル断片切り出し、小さく潰した後、200 μ l 程度のアクリルアミド用 DNA 溶出液 [0.5 M 酢酸アンモニウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) SDS] に浸して 37°C で一晩放置した。シリコン化したガラスウールを詰めたポリプロピレンチップ (P1000; Gilson Medical Electronics, Gambetta, France) に入れて遠心 (3,000 rpm 数秒) し、DNA 溶液を回収した。得られた溶液に対してフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈澱を行い、DNA を精製した後、種々の操作に使用した。

DNA の 32 P 標識 ハイブリダイゼーション実験におけるプローブ DNA の 32 P での標識は、Amersham (Ill, USA) のマルチプライム DNA 標識システムを用いて以下の様に行った。反応緩衝液[MgCl₂, β -mercaptoethanol, Tris-HCl (pH 7.8) を含む] を 5 μ l と、4 種のヌクレオチド/緩衝液 [5 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mM EDTA, それぞれの溶液中に dATP, dGTP, dTTP または dCTP のいずれかを含んでいる。] のうち 3 種を各 4 μ l と、プライマー溶液 [ランダムヘキサヌクレオチド, BSA] と、標識する DNA (25 ng; 100°C で 5 分間加熱後、氷中で急冷し変性させた) を 22 μ l と、酵素溶液 [1 unit/ μ l Klenow fragment, 50 mM KH₂PO₄ (pH 6.5), 10 mM β -mercapto-ethanol, 50% グリセロール] を 2 μ l と、および [α - 32 P] dCTP または dATP (10 mCi/ml; ICM) を 4 μ l とを混合して、25°C で 3 時間反応させて標識した。

ゲルからメンブレンフィルターへの DNA および RNA の転移 Southern の方法 (1975) によった。DNA を泳動したアガロースゲルを 0.25 M HCl 溶液に 30 分室温で浸した後、アルカリ変性液 [1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH] に 30 分間浸して DNA を変性させ、中和液 [0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 M NaCl] 中で 30 分ゲルを浸して中和させた。20 x SSC 溶液 (1 x SSC は 0.15 M NaCl, 0.015 M クエ

ン酸ナトリウム)を適量バットに入れ、その液面より上にガラス板を置き(台上またはバットの縁に橋渡しにして)、20 x SSC 溶液に浸したろ紙(3 mm chr, Whatman)をガラスの上に2枚置いて、両端が20 x SSC 溶液に漬かるようにした。そこにゲルを置き、両端にアクリル板を置いて、20 x SSC に浸したメンブレンフィルター(Biodyne A Nylon Membranes; Pall Bio-Support Division, Glen Cove, N.Y., USA)をゲル上に置いた。フィルター上にほぼ同じ大きさのろ紙を4枚重ね、ペーパータオルを5 cm ほど積んでからガラス板をのせ、約500 g の重しを置いて、この状態で一晩放置した。その後、フィルターをゲルから剥し、80°C で2時間吸引オープンで焼き付けた。ホルマリンアガロースゲル中のRNAの転移の際は、アルカリ変性および中和処理を省いて行った。

ハイブリダイゼーション サザンハイブリダイゼーションでは、DNAを固定したフィルターをハイブリダイゼーション液I [0.9 M NaCl, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.3), 5 mM EDTA, 0.1% (w/v) Ficoll (分子量400,000; Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden), 0.1% (w/v) Polyvinylpyrrolidone (PVP, 分子量360,000; 和光), 0.1% (w/v) BSA (Sigma), 0.2% (w/v) SDS, 100 µg/ml calf thymus (CT) DNA (Sigma)] に浸して、65°C 3時間以上保温して予備ハイブリダイゼーションを行った。その後、ビニールバッグの中にフィルターとハイブリダイゼーション液Iおよび³²Pで標識したプローブDNA (100°C で5分間加熱後、水中で急冷して変性させた)とを入れ、65°Cで一晩保温して、フィルター上のDNAとプローブDNA間のハイブリダイゼーション反応を行った。その後、フィルターを取り出し、洗浄用緩衝液 [5 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0), 1 mM EDTA, 0.2% (w/v) SDS] で数回洗浄し、サランラップに包んだ後、カセットに固定しX線フィルムを入れ-80°Cで感光させた。ノザンハイブリダイゼーションではハイブリダイゼーション液Iの代わりにハイブリダイゼーション液II [5 x SSC, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5), 0.02% (w/v) Ficoll, 0.02% (w/v) PVP, 0.02% (w/v) BSA, 0.1% (w/v) SDS, 100 µg/ml CT DNA, 50% (v/v) 脱イオン化ホルムアミド] を用い、温度は42°Cで行った。洗浄は、まず洗浄液I [2 x SSC, 0.1% (w/v) SDS] で2・3回すすいだ後、室温で5分間同液で洗った。さらに、洗浄液II [0.1 x SSC, 0.1% (w/v) SDS] を用いて50°C 15分間洗浄し、これを2回繰り返した。また場合に応じて、

サザンハイブリダイゼーションにもこの方法を用いた。

DNA 塩基配列の決定 DNA 塩基配列の決定は、M13 ファージによるクローニング技術 (Messing 1983) とサンガー法 (Sanger 1981) を組合わせた、Sequenase シークエンシングキット (United States Biochemical; Ohio, USA) を利用した。7 μ l の組換え M13 ファージ単鎖 DNA 溶液 (約1 pmolを含む)、1 μ l のプライマー DNA (0.5 μ mol/ μ l) および 2 μ l の 5 x シークエンシング緩衝液 [200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 100 mM MgCl₂] とを混合し、65°C で 15 分間加温後、室温に放置して徐々に冷却し対合させた。このファージ単鎖-プライマー DNA 混合液に、1 μ l の 0.1 M DTT、2 μ l の適当に希釈したラベリング混合液 [各 7.5 μ M の dGTP, dATP, dTTP]、0.5 μ l の [α -³²P] dATP (3000 Ci/mmol) および 2 μ l の Sequenase 溶液 (U.S. Biochem.) を加え混合し、37 ~ 42°C で 2~5 分間反応させた。この反応液 3.5 μ l ずつを、2.5 μ l の 4 種塩基に対応する停止液 [各 80 μ M の dGTP, dATP, dTTP, および dCTP, 50 mM NaCl, および 8 μ M の ddNTP (ddGTP, ddATP, ddTTP, または ddCTP)] と混合し、さらに同温度で 5 分間伸長反応後、4 μ l の反応停止液 [95% (v/v) ホルムアミド, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) XC, 0.05% (w/v) BPB] を加えて反応を停止させ、95°C 2 分間加熱後急冷して二重鎖を解離させた。得られた 4 種の反応液 2 μ l ずつを尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

β -ガラクトシダーゼ活性測定 酵母細胞抽出液の調製は Rose らの方法 (1981) を改変して行った。酵母培養液 (OD₆₆₀ $\approx$ 1.0) 1 ml を採取して集菌し、菌体を SM 緩衝液 [85 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)] 1 ml で洗浄し、エッペンドルフ遠心管に移した。この菌体を、酵母破碎用緩衝液 [0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 20% (v/v) グリセロール, 1 mM DTT, 1 mM PMSF] 0.5 ml に懸濁し、0.4 g のガラスビーズ (フジストン No.006) 0.4 g を加えて、低温室中 (4°C) でエッペンドルフミキサー (model:5432, Eppendorf) によって 30 分間攪拌した。酵母破碎用緩衝液 0.5 ml を加えて遠心分離 (3,000 rpm, 5分) し、上澄液を別の遠心管に移してさらに遠心分離 (12,000 rpm, 5分) し、この上澄液を酵母細胞抽出液とした。

細胞抽出液中の β -ガラクトシダーゼ活性は、Miller の方法 (1972) に従い以下のように測定した。Z 緩衝液 [0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0), 10 mM KCl,

1mM MgSO_4 , 0.05 M β -mercaptoethanol] 0.9 ml に、4 mg/ml の *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside (Sigma) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 0.2 ml 加えて、28°C で予備加熱後、細胞抽出液 0.1 ml を加えて 28°C で反応を開始させた。反応液が薄く黄色に色づいたところで、1 M Na_2CO_3 溶液 0.5 ml を加えて反応を停止させた。反応時間と反応液の 420 nm における吸光度 (A_{420}) を測定して活性値を算出した。なお、1 単位は 28°C で 1 分間に 1 μmol の *o*-nitrophenol を産成する酵素量とし、1 μmol の *o*-nitrophenol の A_{420} は 4.5 とした。

タンパク質濃度の測定 Bradford らの方法 (1976) に従った。タンパク定量用の染色液 (Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratory, Ca, USA) を脱イオン水で 5 倍に希釈した後、濾過した濾液 1 ml に細胞抽出液 20 μl 加えて混合し、室温で 30 分間反応させた。反応液の A_{595} を測定し、BSA により作製した検量線 (0.1~0.5 mg/ml) からタンパク濃度を決定した。

寒天平板上における酸性ホスファターゼ活性の検出 Toh-e と Oshima の方法 (1974) に従った。 α -ナフチルリン酸 (Sigma) 5 mg, Fast Blue Salt (Merck, Germany) 50 mg を含む 5 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に、50 mg の寒天を 5 ml の脱イオン水に加熱融解した溶液を加えて混合した後、平板培地のコロニー上に重層した。酸性ホスファターゼを産成しているコロニーは、ジアゾカップリング反応によって赤色を呈する。

リン酸取り込み活性の測定 5 ml の YPAD 培地で前培養した細胞を全量集菌し、無菌水で 2 度洗浄後、100 ml の低リン酸または高リン酸培地に植菌した。30°C で 12-16 時間振とう培養した後、3,000 rpm 5 分の遠心分離により集菌し、Burkholder 培地におけるリン酸を同量の KCl に代えた無リン酸培地で洗浄し、菌体懸濁液に最終濃度が 5 $\mu\text{l/ml}$ となるようにシクロヘキシミド溶液を加え、30°C で 30 分予備保温した。高リン酸培地 (P_i 11.0 mM) に適当量の carrier-free の ^{32}P を加え、これを最終濃度が 0.11 mM となるように取り込み反応液に添加した。適宜 1 ml をサンプリングし、10 ml の高リン酸無機塩溶液 (Burkholder 培地よりグルコース、アスパラギンおよびビタミンを抜いた溶液) にサンプルを添加して、 ^{32}P の取り込みを停止させた。この細胞懸濁液をニトロセルロースメンブレンフィルター (25 mm in diameter, 0.45 μm of pore size

; Schleicher & Schull GmbH, West Germany) でろ過し、フィルターを高リン酸無機塩溶液で洗浄した。フィルターを真空オーブンで 90°C 20 分乾燥させた後、液体シンチレーションカウンターで ^{32}P 量を測定した。

酵母細胞の膜画分の調製 β -ガラクトシダーゼ活性測定の項に記述した方法で酵母細胞を破碎して得られた細胞抽出液を 10,000 x g, 15 min, 4°C で遠心分離を行った。そこで得られた上澄液には水溶性タンパクが含まれ沈澱を膜画分とし、適当量の菌体破碎緩衝液に溶解した。

第3節 結果

第1項 *PHO84* 遺伝子のクローニング

pho84 変異を相補する DNA 断片を取得するため、選択符号に *S. cerevisiae* の *URA3* 遺伝子を持つ低コピープラスミド YCp50 をベクターとする酵母染色体 DNA ライブラリー (ATCCより購入) を NS219 株 (*pho84-1 ura3-52*) に導入し、ウラシル非要求性 (Ura^+) 形質転換体を分離した。SGly Ura^- 培地に菌体懸濁液を塗布し、30°C 5 日間培養を行った。約 12,000 個の Ura^+ 形質転換体について、その出現プレートより直接高リン酸 SGly Ura^- 培地にレプリカした。30°C で 2 日間培養を行い、出現したコロニーの活性染色により、染色されなかったコロニーを 50 個選択した。それらについて YPAGly 培地上で単一コロニー分離を行い、そのプレートを SD Ura^- 培地と YPAGly 培地にレプリカを行い、 Ura^+ と rAPase 抑制的生産の両表現型が共分離する株を 1 株取得した。この株よりプラスミド DNA を調製し、NS219 株 (*pho84 ura3*) に再び導入すると *pho84* 変異による rAPase 構成性表現型が抑圧された。このプラスミド DNA を p373 (図1) と命名した。適当な制限酵素で切断し、各断片について調べたところ、p373 は YCp50分子中におよそ 7 kb の DNA 断片が挿入されていることがわかった。

p373 が *PHO84* 遺伝子を含むことを確認するために、染色体への組み込み実験を行った。p373 の 5.6-kb *Bam*HI-*Eco*RI 断片を、組み込み用ベクターである YIp5 の *Bam*HI-*Eco*RI の間隙に挿入してプラスミド pMB13 を作製した。pMB13 の挿入断片内にのみ 1 カ所存在する *Hpa*I 部位の切断により直線化した DNA 断片を、NS216 株 (*pho84 ura3*) に導入した。得られた Ura^+ 形質転換体のうち、独

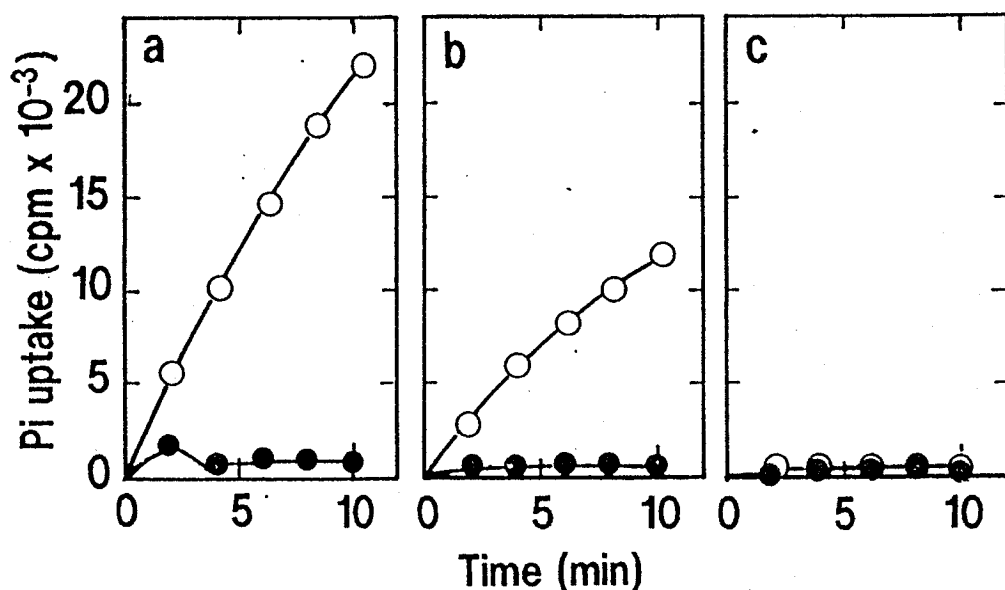


Fig. 2. Pi-uptake by the transformant cells of *S. cerevisiae* harboring plasmids connected with the PHO84 gene. The transformant cells were shaken at 30°C in synthetic low-Pi (O) or high-Pi (●) medium supplemented with appropriate nutrients without uracil. The cells were collected when cell growth reached an optical density at 660 nm (OD₆₆₀) of 1.0, washed and inoculated into synthetic low-Pi medium to give a cell concentration of OD₆₆₀ = 0.1. The radioactivity of the medium was adjusted to 5 x 10⁵ cpm per ml with ³²Pi. The amount of Pi absorbed by the cells was expressed as cpm of ³²P radioactivity per ml in cell suspension of OD₆₆₀ = 0.1. Samples were taken at appropriate intervals and filtered through a nitrocellulose membrane filter. The test strains were (a) MB191 (PHO84⁺) harboring pTI15; (b) MB192 (Δ pho84) harboring p373 (Fig. 1) and (c) MB192 harboring pTI15.

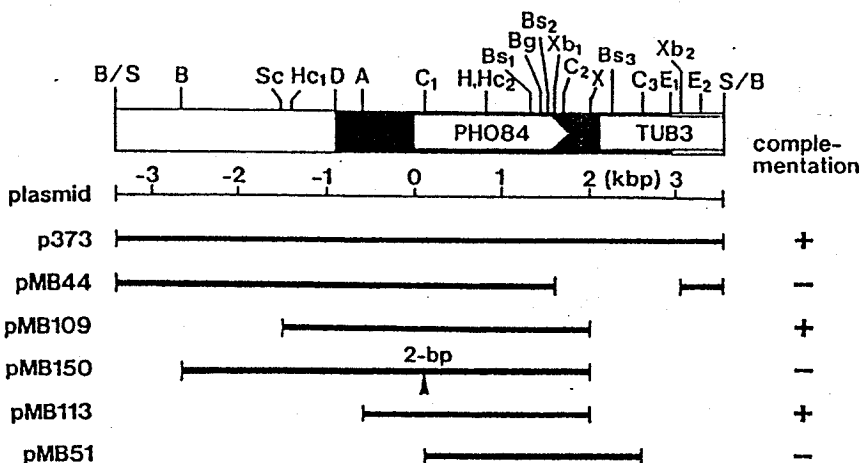


Fig. 3. Restriction map of the DNA fragment cloned on p373 and its derivatives, and their abilities to complement the rAPase constitutive phenotype of a pho84 mutant, NS219. The open and closed boxes at the top indicate the cloned yeast DNA. The closed box with an open arrow indicates the region in which the nucleotide sequence were determined. The open arrow labeled PHO84 indicates the approximate position and direction of the open reading frame of PHO84, and the open region labeled TUB3 indicates the N-terminal coding region of the TUB3 gene. Two or more identical restriction sites in the map are distinguished by suffixes. The lines indicate the PHO84 fragments on the relevant YCp vectors. Plasmid pMB51 consisted of the indicated portion of the cloned fragment inserted at the ClaI site of YCp50, and plasmids pMB113, pMB109, pMB150 are subclones of the indicated portions in vector pT115. pMB44 was constructed by deleting a 1.4-kbp XbaI fragment from p373. The symbols + and - indicate ability and inability of the plasmid to complement the pho84 mutant phenotype. Abbreviations of restriction sites are the same as for Fig. 1, except for D, DraI; Sc, ScaI and Xb, XbaI. None of the DraI sites are indicated, except for that at the end of the sequenced region of the PHO84 DNA. The recognition site for ClaI indicated as C2 overlaps the methylation site of dam.

立に分離した 3 株について rAPase 生産表現型を調べたところ、野生型と同じく高リン酸培地では酵素を生産せず、低リン酸培地では酵素を生産した。次に、形質転換体より染色体を回収し、それを *Bg*III で切断し、1% アガロース電気泳動を行った。移動した DNA をメンブランフィルターに移した後、焼き付け固定し、プラスミド pMB15 より回収した 0.5-kb *Bg*III-*Xho*I 断片 (図1) を ^{32}P で標識したプローブを用いてサザン解析を行った。その結果、クローニングされた DNA 断片が染色体に正しく 1 ヶ所組み込まれたことを確認した (結果省略)。また、それらのクローンのうちの一つの株 MB159 (*MATa pho3 pho84 ura3 leu2 trp1* [*PHO84⁺ URA3*]) と AX-49-4B 株 (*MATa pho3 his4 PHO84⁺*) の交雑二倍体について四分子分析を行った。その結果、28 子囊のうち高リン酸培地上で 0 rAPase⁺: 4 rAPase⁻ を示した子囊が 26個、1 rAPase⁺: 3 rAPase⁻ を示した子囊が 2 個であった。以上の結果より、pMB13 DNA が *PHO84* 遺伝子座あるいはその近傍に組み込まれたと考えられ、クローニングされた DNA は *PHO84* 遺伝子をコードすることがわかった。

取得した DNA が *PHO84* DNA であることをさらに確認するために、*pho84* 変異株のリン酸取り込み不能表現型に対する抑圧能を調べた (図2)。同じ遺伝的背景を持つ菌株 MB191 (*PHO84⁺ ura3*) と MB192 (*pho84::HIS3 ura3*) (MB191 株の *PHO84* 遺伝子を *HIS3* 遺伝子の挿入によって破壊した株; *PHO84* 遺伝子破壊の項を参照) に YCp50 を改変して複数の制限酵素部位を持つ低コピープラスミドベクター pTI15 あるいは p373 を導入し、その株についてリン酸取り込み活性を測定した。MB192 株に pTI15 を導入した株では、高リン酸培地、低リン酸培地にかかわらず、取り込み活性の上昇は認められなかった。MB191 株に pTI15 を導入した株および MB192 株に p373 を導入した株では、低リン酸条件下でのリン酸取り込み活性が上昇した。すなわち、クローン化された DNA により、*pho84* 変異株のリン酸取り込み活性低下の表現型が相補された。

第2項 *PHO84* 遺伝子の塩基配列とマッピング

プラスミド p373 上に回収された 7 kb DNA 断片のどの位置に *PHO84* 遺伝子があるかを限定するため、さまざまな欠失プラスミドを作成した (図3)。7 kb 断片内の 2.5 kb *Apa*I-*Xho*I 間を pTI15 の *Sma*I 部位にサブクローニングすることに

よって得られたプラスミド pMB113 は、*pho84* 変異株の rAPase 構成性表現型を相補し、抑制性表現型を与えた。また、4.7 kb *Bam*HI-*Xho*I 断片内の *Cl*aI₂ 部位に 2 bp の挿入を行えば（プラスミド pMB150）、*pho84* 変異に対する相補能を失った。これより、*PHO84* 遺伝子は 2.5 kb *Apa*I-*Bam*HI 断片に存在すると結論した。

2.5 kb *Apa*I-*Xho*I 間を含む 3.9 kb *Dra*I-*Eco*RI 断片を、プラスミド pUC118 または pUC119 にサブクローニングし、そのプラスミド DNA を用いて塩基配列の決定を行った。その結果、3.9 kb 断片内には 1788 bp からなる翻訳可能領域 (open reading frame; ORF) を一つ見いだした (図4)。この ORF の 5' 非翻訳領域には TATA 類似配列が 2 カ所 (翻訳開始コドンのアデニンを +1 としたときに -122 から -118, -99 から -95) 存在する。転写終結配列として提唱されている TAG..TAGT..TTT (Zaret and Sherman 1982) は *PHO84* 遺伝子の 3' 非翻訳領域には見いだせなかった。

PHO5 遺伝子の転写調節に必要な Pho4 タンパク質 (Oshima 1982; Yoshida *et al.* 1987) は、*PHO5* 遺伝子上流に結合することがわかっている (Ogawa and Oshima 1990; Vogel *et al.* 1989)。Hayashi and Oshima (1991) により、5'-C ACGTG-3' あるいは 5'-CACGTT-3' の 6 bp 配列が *PHO8* 遺伝子の脱抑制に必要で、この配列に Pho4 タンパク質が結合することが明らかにされた。*PHO84* 遺伝子上流にも 5'-CACGTG-3' が 3 コピー、5'-CACGTT-3' が 1 コピー存在している。

PHO84 ORF 下流に Schatz ら (1986a) が塩基配列を決定した *TUB3* 遺伝子 ORF の一部を見いだした。*TUB3* 遺伝子座はすでに第 XIII 番染色体の左腕、*GAL80* よりテロメア側 67 cM の位置に決められている (Schatz *et al.* 1986b)。*PHO84* 遺伝子の染色体上の位置を確認するため、MT8-1 (*MATa leu2 gal80::LEU2 PHO84⁺*) と MB137 (*MATα leu2 GAL80 pho84*) 間の交雑により得られた二倍体を四分子分析に供したところ、*Leu⁺/Leu⁻* と *PHO84⁺/pho84⁻* 遺伝子の符号について、90 子囊が両親二型:非両親二型:テトラ型 = 31:5:54 の分離比を示した。この結果から Perkins (1949) の式より、*pho84* と *gal80* との距離は 45 cM と計算される。これは先ほどの *tub3* と *gal80* 間の距離が 67 cM との報告と矛盾しない。また、*PHO84* 遺伝子と *TUB3* 遺伝子とは同じ方向に転写され、*PHO84* 遺伝子の終結コドンと *TUB3* 遺伝子の開始コドンとは 355 bp しか離れていない。以上の結果、*PHO84* 遺伝子と *TUB3* 遺伝子は近接して第 XIII 番染色体の左腕に存在する

1550 85LEII 1600
TTGGGTACTCTAATCGACCACTAAGCTGTGCTAGAGACGGTAAGCAACCACTGTGGTTACCTCAGCTCATGGAATTTTCGCCCTTATTC
511 L G T L I D H N C A R D G K P T N C W L P H V N E I F A L F
1650 XbaI 1700 ClaI
ATGTTGTTGGGTATCTTCACAACCTTGTGATCCCGAAGAACTAAGGAAGAAGCTCTAGAGAAATTAACGAGCTATACCAGCATGAATC
541 M L L G I F T T L L I P (T) K R K T L E E I N E L Y H D E I
1750 1800
GATCTGCTAGCTAACTTCAGAAACAAGATAATGACATTGATCTTCAGCCCACTCTCAACTTCAACATGAAGCATAAAGCCCTCAA
571 D P A T L N F R N K N N D I E S S S P S Q L Q H E A *
1950
AGATGCACATAAACTTGTAACTAGACAATAATACAAAACATTTTATAAATCTATTATCAACCCCTTACATAATCTATAAATACI
1900 1950
GTCAGGTTACATATTTATTCGATAATTTCTTTTAATTTCAATTTTCTCCACATCTCTCGCCATCCTGTGCTGGTGCCACAGCAGAGC
2000 XhoI 2050
ATATCGCTCTTTCTTTTATGCTCAGAGCTTACCCGACATATCATTTCTCGAGCCCTCGGAACCCAGCAACGTTTACAAATTCGACA
2100 2150
TCTAAAGAAATATAACACAGATCAGGTATCTCATAAGTACATTATCTGCACTAAGCAAGCGACTTGAGACAATGAGAGGTCATTAG
M R E V I S
2200 2250
TATTAATGGTATGATCGGTTCCCTTTTTTGTTCATATTCGCAACCAATGGCACCTGTGGGACAGGGAAGAAGTTTGAATCTGATCTGG
I N
85LEII 2300
TTTGATTCATCCCAATTTGGTCACCATCTGGTTGATTACCGCAAAATATTTGACTTGTACCCAGCAGATTTACTAACGTTCTTTTTC
2350 2400
TCCATTTTTCTGGCATACTCGGACGAAAGCTCATAATGACCTCATTACATGGCGAGTGATTTTGTGCTCTCTCTCGGAGGAT
2450 2500
TGCTGGAACCTTTGTATTTTCTTTTACACAGTTGGTCAGCAGGTTGTCAATAGGTAAATGCTGCTGGGAATTGTACTCCCTAG
V G Q A G C Q I G N A C W E L Y S L
2550 2600
AGCATGGCATCAAGGAAGACGGCCATTGGAGAGTGCCCTGTGCAAAACCTAAGCGAGGTGAAGAAGGATTTTCTACATTTCTCCATGAAA
E N G I K E D G H L E D G L S K P K G G E E G F S T F F H E
2650 ClaI 2700
CGGGGTACGAAAATTCGTCCTCAAGAGCAATCTACGTGGAATTAGAGCCCAATGTTATCATGAGTACGTACAGGACGTTTCAAGGAC
T G Y G X F V P R A I Y V D L E P N V I D E V R T G R F X E
2750
TTTTCATCCAGAACAAATTGATTAACGGTAAGGAAGATGCCCAATACATACGCAAGAGGCCATTATACATGGGTAGAGAAATAGTGG
L F H P E Q L I N G K E D A A N N Y A R G H Y T V G R E I Y
2800 2850
ATGAAGTTCAAGAAAGAATTAGAAGATGCCGACCAATGTGACGGTTTACAAAGGTTCTGTTACCCACTCCCTCGGTGGTGAACGTG
D E V E E R I R K N A D Q C D G L Q G F L F T H S L G G G I
2900 EcoRI
GTTCCGGTTTAGGTTCCCTGTTATTAGAAAATTTATCGTATGAATACGGGAGAAATCCAAATTTGGAAATC
G S G L G S L L L E N L S Y E Y G K K S K L E F

1

PH084 51 ESIDDEGFGWQMKTISIANGVGFTDSYDIFAINLCIT--MMSYVYHCSMP-----
 GAL2 61 PK-KPMSEYVTVSLCLCVRFG-GFM-FGHTSTISGFVVQTD-FLRRFGNK-IHKDG-THY--
 SNF3 86 SE-PPQKQSMMSICGVFVAV--G-GFL-FCYITGLIN-SIT-SNIVYKSIYAPN-----HD--
 HGT 1 ME-PSSK-KLTIRLMLAVGGAVL-G-SLQ-FCYNTGVINAPQKVIEEFYN--QTWVHRYGESILPT
 Xyle 1 M--NTQYNSS-YIFSIT--LVATIG-GLL-FCYITAVISGT--VESLN---T-VFVAPQNLSE-SA
 AraE 11 --TPRSLDITRRMNFV-SVAAAVA-GLL-FCYITGVIAAGA--LP--FI--TDHFV---L---T-

2 3

PH084 101 GP--SRTLLKM-STSVGTMLCQEGFGIADIVGRKR--IYGVETIIMIVCTILQTTVAH--SPAINF
 GAL2 116 -LSNVIRCLIMAFNLCFAFGIILSKGCDNYGRKGLSIVSVYIVGIIIRIASIN-----
 SNF3 137 SFTAGGNSILVSLFSLGTFFGALTAPFISDSYGRKPTIIFSTIIFISIGNSLVAGAGG-----
 HGT 60 TLTLTW-SLSMAIFSVGGMTGSESVGLFVNRFGRNSMLMNLAFVSAVLNGFSKLGKS-----
 Xyle 53 ANS-L-LGFCVASALICCIIGCALGQYCSNRFGRDLSKIAAVLFFISGVGSAWPELGFTSINPDN
 AraE 58 --SRL-QEWMVSSMMLCAALGALFNGLSFRIGRKYSLMAGAILFVLGSIGSA---FATS--

4 5

PH084 160 VAHSPAINFVAVITFYRIVMGIGIGCDYPLSSIITSEATIKKRGATMGAVFANQAWGGSIGGIIA
 GAL2 172 -----KQYQFICRIISQLVGGIAVLCPMLISEIAPKHLRGTFLVSCYQLMITAGIFLYCYTN
 SNF3 195 -----ITLLVGRVISGIGIAISAVVPLYQAETHKSLRGALISTYQWAITGCLLVSSAVS
 HGT 119 -----FEMLLGRFIIICVYCOLTTGTFVPMYGVGVSTIARGLGLTLHQIGIVVGLLIAQVFG
 Xyle 117 TVPVYLACYVPEFVIYRIIGGIGVGLASMLSPMYIADLPAHIRCKLVSENFQFAIIFGGL-LVYCV
 AraE 112 -----VENIIAARMVLCIAGCIASYTAPLYLSAASENVRCMKISMYQLMVTLC-----IVLAF

6

PH084 227 QILVAYGELEYANSGAECDAQCQKACDQMWRIILIGLGTVLGLACTYFRITIPESPRYQIDVNAK
 GAL2 230 YGTSYSNSVQ-----WRVPLGLCFANSLFMIGALTLPESPRYLCEVNAK-
 SNF3 252 QGTIAKNDASS-----YRIIFIGLVYVSSFLAIGMFFLPESPRYV-LKDK
 HGT 176 DSDIGNN-----DLMPLLSIIFIPALLQCIPLPFCPESPRFL-INRN
 Xyle 182 NYFIARSGDASWLT-----DCWRYNFASECIPALLFLLMLLYVLESPPR-WL-MSRG
 AraE 166 LSDIYFS--YS-GN-----WRAMLGVLALPAVLLIILVVFLESPPR-WL-AEKG

7

PH084 293 LELAAAAEQDGEKKIHDTSDED-MAINGLERASTAVESIDNHPPKASFKDFCHFGQWKYCKILL
 GAL2 295 VELAKRSI--AKSNKVSPE-DPAVGAELDLIMAGIEAKIAGNASHWGELF-STKT---KVQRILN
 SNF3 297 LDEAAKSLSF--LRGV-PVHDSGLLEELVEIKATYDYEASFSGSNFIDCFISSKSRPKQTLRMFT
 HGT 220 EENRAKSVL-KK-LRG--TAD--VTHDLQEMKEESRQMMREKKVTILELFRSPA---YRQHTII
 Xyle 232 KQEGAEGL-RK-IMG-----NTLATQAVQEI-K-HSLDHGR--K-TGGRL-----LMFGVGVIVI
 AraE 210 RHIEAEVL-RM-LRD-----TSEKAREELNEIR-ESL---KLKQGGWALFKININ---VRRAVFL

8

PH084 358 GAGYWFITLMAFYGLSLNSAVILQIIGYAGSKNVYKKLYDAVGNIIITCAG--SPGYHVSVFT
 GAL2 334 GVFVQMQQLTGNNYFFYYGTVIFKSVGL-----DDSFETSLVGVVNFASFTEFLMT
 SNF3 359 GIALQAEFRQFSGINFIYYGVNFNKTGV-----SNSYGVSEITYAVNVFNVPGLEF
 HGT 275 AVVLQLSQQLSGINAVFYYSITSEKAGV-----QQPVYATIGSGIVNTAFTVVSLEF
 Xyle 281 GVMLSIERQFQGVINVLVYIAPVFKILCA-----SDIALQTLIVGVINIFTVLAIMT
 AraE 262 GMLLQANQQFTGNNIIMYYAPRIIFKMAC-----FTTIEQQMIATLVVGLTFMFATFIAVFT

9 10

PH084 422 VDIIRKRFQIAGFIILT--ALFCVIGFAYHKIGD-----HQLDALYVICFFQNEGP--N
 GAL2 387 VENLGRKCLILGATMMACMVIYASVGVTRLYPHGKSQSPSSKGANCMIVF-IDFYIFCYATTWA
 SNF3 412 VEFFGRKVLVVGCVIM-TIANFIVAI--VGCSF--KTVA--AKV-MIAF-ICLFIAAFSATWG
 HGT 328 VERAGRRTLIILGLAGM-AGCAILMTIALA-L-LEQLPMWSYL-----SIVA-IFGEVAFPEVGP
 Xyle 336 VDKFGRKPLGICALMAIGMFSLGT--AF--YTQAP-----GIV-ALLSM-LF-YVAAFAMSWG
 AraE 318 VDKAGRKPALKIGFSVMALGTLVLGYCLNQFDNGTASS-----GLSHLSVGM-TMNCIAGYAMSA

11 12

PH084 474 TTTFVPGCEFPTRYRSIAG--ISAASKVGAIIAQTALGLIDHN-CARDCKFTNCLPHHMEI
 GAL2 452 PVAHVITAEFFL--RVKSKMALASASNWMGFL-----IAFFTPFI-----ISAINFYGYV
 SNF3 468 GVVWVISAEYPLGVRSKCT--ATIAANWLVNFI--CALITPYI-VDTCSHISLGAKEFFI
 HGT 385 PIPWFIADLESQGPAPAI--AVAGFNWTSNFI--VGMCFQY--V--EQLCCGVNFI
 Xyle 389 PVCWVLLSEIFNAIRCHAL--ATAVAAQLANYF--VSWTFPMMDKNSWLVAHFHNGFSYWI
 AraE 378 PVVVILCSFIQPLKCDFGI--TCSITTNVSNMI--IGATFTLLDSIAAGTFELYTALNI

PH084 537 FA-LFMILGIFTLLIPETKRTLEEINELYIDEIDATLN-ERNKNDI--ESSPSQLQHEA
 GAL2 504 FMGCLVAMFFYVFFVETKGLSLEEIQELHEEGVLEWKS--EGWIPSSR-RGN--
 SNF3 526 WGSINAMGVVVYTVVETKGLFLEEIDELYIKSTGVVSPKE-NI-DIIRALKFDYDLQR..
 HGT 437 ETIVLVVFFFTYFKVPETKGRIFDEIASGFRQGGASQSDKTEELFHP-L-GADSRV
 Xyle 448 YGCNGVLAALINWKFVPETKRTLEELEANE--PETKKTQQTATL
 AraE 437 AFV---GITF-W-LIPETKNVLEFI-ERKLMAKEKLRNIGV

Fig. 5. Sequence and structural homology of the predicted Pho84 protein with various sugar transporters. Symbols: PHO84, predicted Pho84 protein; GAL2, galactose transporter of *S. cerevisiae* (Szkutnicka et al. 1989); SNF3, high-affinity glucose transporter of *S. cerevisiae* (Celenza et al. 1988); HGT, HepG2 glucose transporter of human (Mueckler et al. 1985); XylE and AraE, xylose and arabinose transporters of *E. coli* (Maiden et al. 1987). The amino acid sequences of the proteins are aligned to obtain maximum fitting with the Pho84 sequence. Identical residues of the Pho84 protein with those of other proteins are boxed. The lines above the Pho84 sequences with numbers from 1 to 12 indicate putative membrane-spanning segments with 21 amino acid residues deduced from the hydropathy plot shown in Fig. 6. The numbers on the left represent the positions of the first amino acid residues of the indicated protein. Dashes indicate gaps introduced to optimize the alignment.

と結論した。

第3項 Pho84 タンパク質の構造

PHO84 ORF より推定されるタンパク質には 596 個のアミノ酸残基が存在した。このアミノ酸配列と European Molecular Biology Laboratory タンパク質データベース (Release 12.0; October, 1989) とを GENETYX program (Software Development Co., Tokyo, Japan) を用いて検索したところ、*S. cerevisiae* の SNF3 遺伝子がコードするグルコース輸送体 (Celenza et al. 1988) と相同性があることを見いだした (図5)。Snf3 タンパク質は、哺乳類や酵母そして細菌などの種々の糖輸送体と相同性があることがわかっている (Celenza et al. 1988; Szkutnicka et al. 1989)。そこで Snf3 タンパク質と相同性のある他の糖輸送体のアミノ酸配列と Pho84 タンパク質のアミノ酸配列とを比較したところ、Snf3 と同様に相同性がみられた (図5)。また、Pho84 タンパク質と Snf3 タンパク質のアミノ酸配列より Kyte and Doolittle の方法 (1982) を用いて計算される親

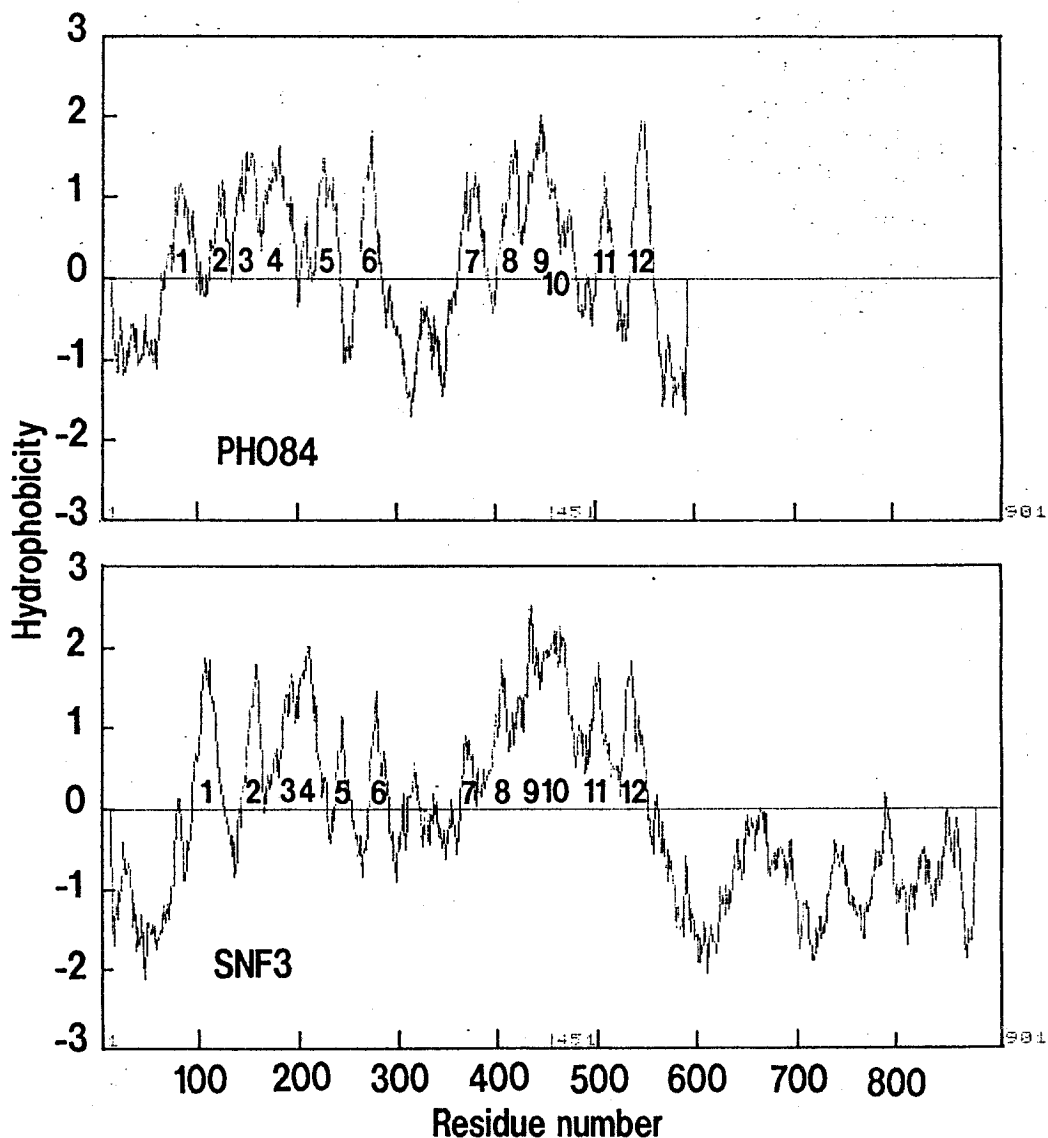


Fig. 6. Hydrophobicity profiles of the predicted PHO84 and SNF3 proteins. Hydropathy values for a window of 21 amino acid residues were averaged, assigned to the middle residue of the span, and plotted with respect to position along the amino acid sequence. The numbers refer to putative membrane-spanning domains predicted by the algorithm of Eisenberg (1984).

水性疎水性値を比較したところ、これにも類似性がみられた(図6)。そして、Pho84 タンパク質には、21 アミノ酸残基よりなる 12 個の膜貫通領域が存在すると結論した。この配置を、Pho84 タンパク質について Eisenberg (1984) のアルゴリズムにより決定したところ、74 アミノ酸からなる親水性領域をはさんで、疎水性アミノ酸からなる膜貫通領域が 6 個を一つの単位として、2回繰り返す構造となることが推定された。その他の構造上の特徴としては Pho84タンパク質のアミノ酸残基の 63 番目から 297 番目(膜貫通領域の 1 から 6 を含む)と 418 番目から 566 番目(膜貫通領域 9 から 12 を含む)は、Snf3 タンパク質をはじめとする種々の糖輸送体とアミノ酸レベルで 25% の相同性を示した。しかし、中央の親水性領域と膜貫通領域の 7 と 8 には相同性は見られなかった。アミノ末端の 55 アミノ酸は親水的であり、シグナル配列は存在しないと考えられる。N-グリコシド型糖鎖の結合可能領域(Lehle and Bause 1984)が473 番目のアスパラギン残基に存在した。

第4項 PHO84遺伝子破壊の影響

PHO84 遺伝子の機能を探るため、PHO84 遺伝子破壊株を作成し、その表現型を調べた。HIS3 DNA の挿入によって破壊された PHO84 遺伝子を含む BamHI-EcoRI DNA 断片を pMB93 と pMB123 の両プラスミドより調製し、二倍体株 NBW5 (*his3* /*his3* PHO84⁺/PHO84⁺) を Rothstein (1983) の方法により導入して、His⁺ 形質転換体を得た。無作為に選んだ 6 株について四分子分析を行ったところ、His 表現型は 2⁺ : 2⁻ に分離し、His⁺ 分離株はすべて Pho84⁻ の表現型を示した。この結果より、His⁺ 形質転換体は PHO84⁺/*pho84* の遺伝子型であり、PHO84遺伝子は細胞増殖に必須の遺伝子ではないことがわかった。

第5項 PHO84 遺伝子の発現調節

低い Km 値を持つリン酸取り込み系は、培地中のリン酸濃度により rAPase と同一の制御系によって、その発現が制御されていることがわかっている(Ueda and Oshima 1975; Tamai et al. 1985)。そこで、PHO84 遺伝子の転写がリン酸濃度による制御を受けるかを調べるため、種々の *pho* 調節遺伝子変異株 *pho2*, *pho4*, *pho80*, *pho81* あるいは PHO84 遺伝子破壊株を、低リン酸または高リン酸

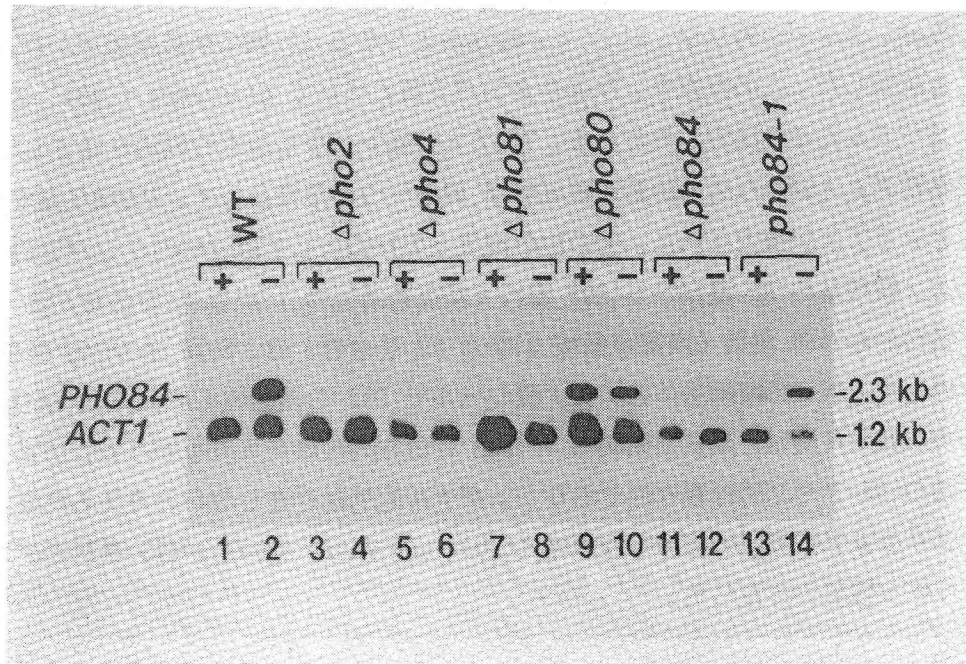


Fig. 7. Detection of the PHO84 transcript by Northern hybridization. Total RNAs were prepared from cells of strain P-28-24C (wild type; WT), NBD2-1 (Δ pho2), NBD4-1 (Δ pho4), NBD80-1 (Δ pho80), NBD81-6D (Δ pho81), MB192 (Δ pho84), and NS219 (pho84-1) grown on nutrient high-Pi (+) or low-Pi (-) medium. Samples of 10 μ g of total RNA were used. After electrophoresis, the lanes were hybridized with a 32 P-labeled 0.7-kb ClaI-HpaI fragment of the PHO84 DNA and a 1.0-kb XhoI-HindIII fragment of S. cerevisiae encoding the ACT1 gene as probes. The specific activities of both probes were 1.0×10^8 cpm/ μ g DNA. 25S and 18S ribosomal RNAs visualized by staining with ethidium bromide were used as size markers as described by Philippsen et al. (1978).

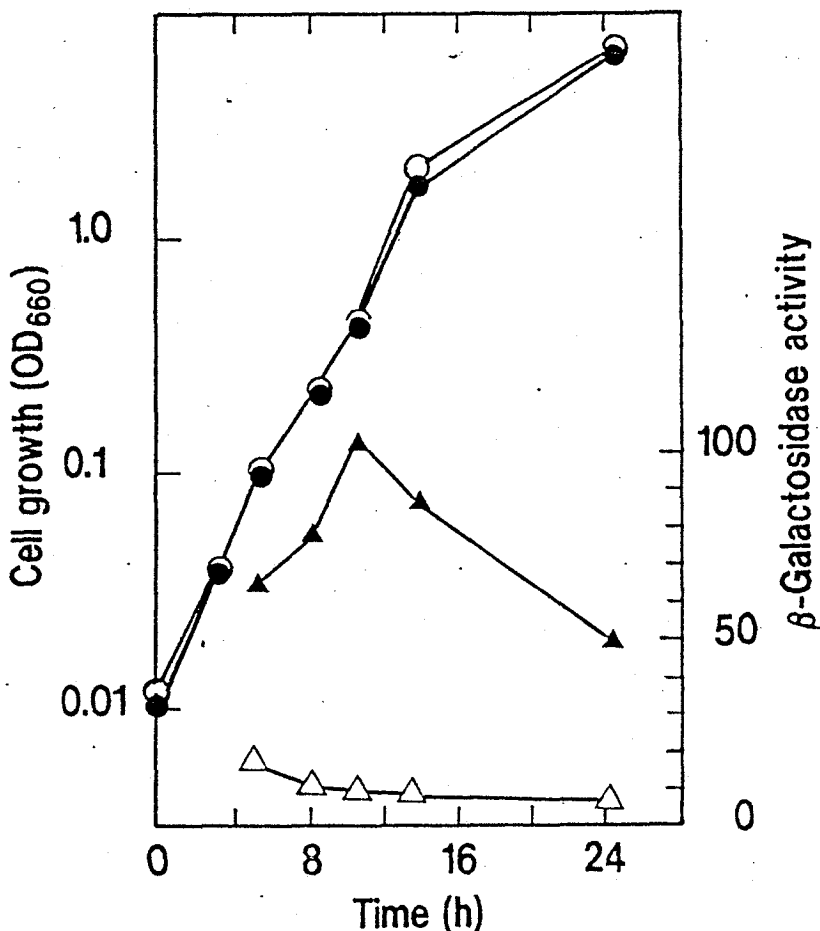


Fig 8. Time courses of change in β -galactosidase activity in transformant harboring the PHO84-lacZ gene-fusion plasmid, pMB142. Cells of the transformant of DKD-5D harboring plasmid pMB142 were pre-cultivated at 30°C for one day in 5 ml synthetic high-Pi medium supplemented with appropriate nutrients but without tryptophan. The cells were harvested, washed with sterile water, and inoculated into 100 ml of nutrient high-Pi (open symbols) or low-Pi (closed symbols) medium to give OD₆₆₀ = 0.01. The cultures were shaken gently at 30°C and assayed for β -galactosidase activity (Δ and $\blacktriangle$) (units/mg protein). Cell growth ($\circ$ and $\bullet$) was monitored as the OD₆₆₀ of the cultures.

完全培地で 12-16 時間の培養を行い、その菌体より抽出した全 RNA に対してノザン解析を行った (図7)。プローブとしては、*PHO84* DNA の一部を含む 0.7 kb *Cla*I-*Hpa*I 断片および *S. cerevisiae* の *ACT1* 遺伝子を含む 1.0 kb *Xho*I-*Hind*III 断片を 32 P で標識して使用した。低リン酸培地で培養した野生型株では、およそ 2.3 kb の位置に一つバンドが検出されたが、このバンドは高リン酸培地培養株では検出できなかった。*pho2*, *pho4*, *pho81* 遺伝子破壊株では、*PHO84* 転写物は認められなかった。*pho80* 遺伝子破壊株では、培地中のリン酸濃度にかかわらず、*PHO84* 転写物が認められた。*pho84* 変異株では、高リン酸条件下においても、*pho84* 転写物が検出されたが、その検出シグナルは、低リン酸条件下に比べて非常に弱いものであった。これらの結果より、*PHO84* 遺伝子の発現は、*PHO5* および *PHO81* と同様に *PHO* 制御系の支配を受けていることが明らかとなった。

さらに *PHO84* 遺伝子の発現が、培地中のリン酸濃度により制御されている事を確かめるために、プラスミド pMB142 上の *PHO84-lacZ* 融合遺伝子の発現について調べた。*PHO84* DNA 由来の 2.3 kb *Hinc*II 断片には、1.4 kb の 5'-非翻訳領域と *PHO84* ORF のアミノ末端部をコードする 867 bp が含まれている。*PHO84* 遺伝子のアミノ末端コード部と *lacZ* 遺伝子のカルボキシル末端側をコドンフレームが合うように結合して *PHO84-lacZ* 融合遺伝子を作成した。DKD-5D 株 (*trp1*) に pMB142 プラスミドを導入し、得られた *Trp*⁺ 形質転換体を高リン酸または低リン酸培地で培養を行い β -ガラクトシダーゼ活性を測定した (図8)。 β -ガラクトシダーゼ活性は高リン酸培地で抑制され、低リン酸培地で脱抑制されることがわかった。以上の結果より、*PHO84* 遺伝子の発現はリン酸により転写レベルで制御され、その濃度が低いときに脱抑制すると結論した。

第6項 *Pho84*- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質の細胞内局在性

すでに述べたように (第3項)、*Pho84* タンパク質は、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列より、リン酸輸送体であると考えた。*Pho84* タンパク質がリン酸輸送体であれば、*Pho84* タンパク質は細胞膜中に存在すると考えられる。このことを調べるために、*Pho84* タンパク質のN末端側から 6 個の膜貫通領域を含む 289 アミノ酸をコードする DNA と、 β -ガラクトシダーゼをコードする DNA をコ

Table 2. β -Galactosidase activity in membrane and supernatant fractions

Plasmid	Gene-fusion	Cell extract	β -Galactosidase ^a activity	
			Membranes	Supernatant
pSH530	<u>HIS5-lacZ</u>	1130 $\pm$ 260 (100) ^b	65 $\pm$ 17 (5)	1090 $\pm$ 150 (96)
pMB143	<u>PHO84-lacZ</u>	2160 $\pm$ 250 (100)	1880 $\pm$ 246 (87)	221 $\pm$ 82 (10)

^a β -Galactosidase activities (units per mg protein) of the transformants are shown as means for triplicate determinations.

^b Figures in the parentheses indicate activities as percentages of those of the unfractionated cell extracts.

ドンフレイムを合わせて結合し、これを担う YEp 型プラスミド pMB143 を NBW5 株に導入し、融合タンパク質を生産させた。その細胞について細胞破碎を行い、上澄画分と膜画分に分画し、各画分における β -ガラクトシダーゼ活性を指標として、融合タンパク質の細胞内局在を調べた。対照として細胞質内に存在するタンパク質と考えられる *HIS5-lacZ* 融合遺伝子 (Nishiwaki *et al.* 1987) を担う pSH530 よりの β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。低リン酸完全培地で 30°C 16 時間培養した形質転換体の細胞を洗浄し、菌体の破碎を行った後に遠心分離により上澄画分と膜画分とに分画した。pMB143 を持つ形質転換体では膜画分の方にほとんどの β -ガラクトシダーゼ活性が検出されたが、対照の pSH530 による形質転換体では大部分の活性が上澄画分の方に検出された。この結果より Pho84 タンパク質は膜に存在し、N 末端から 289 個のアミノ酸残基が膜への移行に十分な領域であると考えている。

第4節 考察

pho84 変異株の rAPase 構成性表現型を相補する DNA を取得し解析を行った結果、遺伝子の塩基配列より推定されるアミノ酸配列は、哺乳類・酵母・大腸菌で報告されている糖輸送体と相同性がみられた。さらに、*PHO84-lacZ* 融合遺伝子が

ら発現された β -ガラクトシダーゼの活性が、膜画分より検出されることより、*PHO84* 遺伝子は *S. cerevisiae* のリン酸輸送体をコードすると結論した。

S. cerevisiae のグルコース輸送体をコードする *SNF3* (Celenza *et al.* 1988) をはじめとする HGT (Homologous Group of Transporters) スーパーファミリーに属するタンパク質 (Mueckler *et al.* 1985; Maiden *et al.* 1987; Cheng and Michels 1989; Szkutnicka *et al.* 1989) の特徴として、6 個の膜貫通領域を 1 つの単位としてそれを 2 単位持つ構造が知られている (Celenza *et al.* 1988; Szkutnicka *et al.* 1989)。HGT スーパーファミリーの輸送体には膜貫通領域 2 と 8 には GRR 配列が、膜貫通領域 6 と 12 には PESPR と PETK の配列が保存されているが (Szkutnicka *et al.* 1989)、これらの配列は *Pho84* タンパク質にも存在する。ヒトのグルコース輸送体では、膜貫通領域 7 と 8 に極性のあるアミノ酸が α ヘリックスの一つの表面上に存在すると考えられており (Gould and Bell 1990)、それが糖を取り込む輸送路を形成していると考えられている。HGT スーパーファミリーに属するタンパク質では膜貫通領域 7 と 8 において、多くのアミノ酸に共通性が見られるが、*Pho84* タンパク質にはこれらとの共通性は見られなかった。最近の報告では、17 個の HGT スーパーファミリーに属するすべてのタンパク質間で、保存されているアミノ酸が 13 個示されている (Kruckeberg and Bisson 1990)。*Pho84* タンパク質でもこの 13 個のうち膜貫通領域 7 にある 2 個を除き、11 個が保存されている。しかし、ヒトのグルコース輸送体の膜貫通領域 11 に存在するトリプトファンはサイトカラシン-B の結合部位と考えられている残基であり (Walmsley 1988)、HGT スーパーファミリーに属する多くのタンパク質で保存されているが、*Pho84* タンパク質ではリジンとなっている。これらの違いは *Pho84* タンパク質と他の輸送体との基質の違いによると思われる。これまで知られている他生物のリン酸輸送体と *Pho84* リン酸輸送体とのアミノ酸配列を比較しても、その構造に強い類似性は見られなかった。*Neurospora crassa* の *pho-4⁺* 遺伝子がコードするリン酸輸送体では *Pho84* タンパク質と同様に 12 カ所の膜貫通領域が存在するが、大きな親水性領域が膜貫通領域 8 と 9 の間に存在する (Mann *et al.* 1989)。ラット肝臓のミトコンドリアに局在するリン酸輸送体では推定される膜貫通領域数が 6 個である (Ferreira *et al.* 1989)。Ambudkarら (1990) によると、二次能動輸送体では、膜貫通領域

を 6 個持つタンパク質は二量体で、12 個存在するときは一量体で機能するとしており、それに従うと Pho84 は一量体で存在すると考えられる。

pho84 遺伝子破壊株はリン酸輸送体が破壊されたにもかかわらず、致死にいたらなかった。この事実は、リン酸に対する親和性が違うリン酸取り込み系が 2 つ以上存在し、Pho84 タンパク質は高親和性の取り込み系に関与するが (Tamai *et al.* 1985)、低親和性の取り込み系には関与しないとするこれまでのモデルと矛盾しない。

第5節 要約

pho84 変異表現型の一つである rAPase 構成性表現型を相補する DNA 断片を取得し、解析を行った。その結果、*PHO84* 遺伝子がリン酸輸送体をコードしていると結論するに至った。*PHO84* 遺伝子より推定される Pho84 タンパク質のアミノ酸残基数は 596 で、その配列はヒトのグルコース輸送体をはじめとして、種々の糖輸送タンパク質と有意な相同性を示した。アミノ酸の親水性疎水性値より推定されるタンパク質の二次構造は、74 個の親水性アミノ酸をはさんで 6 個の膜貫通領域が 2 回存在するものであった。*PHO84* 遺伝子の転写は *PHO5*, *PHO8*, *PHO81* 遺伝子などと同じく、培地中のリン酸濃度により制御されていた。*PHO84-lacZ* 融合遺伝子よりつくられる β -ガラクトシダーゼ活性は膜画分より回収されることより、Pho84 タンパク質は膜タンパク質であることが強く示唆された。四分子分析および塩基配列を決定した結果、*PHO84* 遺伝子は第 XIII 番染色体上に存在することがわかった。

第2章 ヒ酸耐性変異株の分離と性格付け

第1節 緒言

野生型 *S. cerevisiae* におけるリン酸取り込み系には、親和性の違いによって2つの系が存在すると考えられている (Tamai *et al.* 1985)。さらにその一つは培地中のリン酸濃度による制御を受けることがわかっている (Tamai *et al.* 1985)。第1章での解析により、*PHO84* 遺伝子がリン酸輸送体をコードすることを明らかとした。*E. coli* のリン酸取り込みに関与する遺伝子は複数得られているが (Rao and Torriani 1990)、*S. cerevisiae* では *PHO84* 遺伝子だけである (Ueda and Oshima 1975)。過去に、リン酸取り込み系の解析法の一つとして、リン酸のアナログを用いた解析が行われてきた。例えば *Neurospora crassa* では、野生型株に対して致死効果を持つバナジン酸に対する、その耐性変異株を取得したところ、そのなかに高親和性リン酸取り込み系欠損変異株が存在した (Bowman *et al.* 1983)。また、*E. coli* や *Anabaena variabilis* では、ヒ酸を阻害剤として、リン酸取り込み系の生化学的解析が行われている (Bennett and Malamy 1970; Wilsky and Malamy 1980; Thiel 1988)。バナジン酸やヒ酸は、細胞内でリン酸が関与する酵素反応に対して、リン酸同様の挙動を示し、代謝や増殖を阻害すると考えられている (Johnson 1971; Willsky *et al.* 1985)。

本章では、リン酸取り込み系に関与する新しい遺伝子を取得することを目的として、ヒ酸耐性表現型と rAPase 構成性表現型を同時に示す変異株の取得を行った。まず、*pho84* 変異株を調べたところヒ酸耐性であったが、他の *PHO* 系の調節遺伝子変異株では感受性であった。さらに *pho84* 変異と異なるヒ酸耐性表現型および rAPase 構成性表現型を示す変異株を分離した。遺伝解析の結果、両表現型が二重変異により引き起こされることを明らかにした。それらの変異をそれぞれ *pho86*, *pho87* 変異と命名した。*pho86 pho87* 変異株では、ヒ酸耐性、rAPase 構成性表現型ばかりでなく、*pho84* 変異株と同様にリン酸取り込み活性も大きく低下した。しかし、*pho86 pho87* 変異株において、*PHO84* 遺伝子は構成的に発現していた。これらの結果より、Pho86 タンパク質と Pho87 タンパク質は、*PHO84* 遺伝子の転写以後の段階で、低リン酸条件下で脱抑制されるリン酸取り込み系に

関与することが示唆された。また、rAPase 非生産性表現型を引き起こす rAPase 生産調節遺伝子の変異である *pho2*, *pho4*, *pho81* 変異と *pho84* 変異との二重変異株がヒ酸感受性になることを明らかにした。

第2節 実験材料および実験方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第1章において記述した以外の内容について以下に記述する。

供試菌株とプラスミド

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表3 に示す。*PH087* 遺伝子のクローニングの際に用いたλファージの指示菌として *E. coli* LE392 株を使用した。プラスミド pAC613 はプラスミド pMB15 (図1) を *Eco*0109I で切断後、Klenow fragment で平滑化した。それを、*Xho*I 処理して得られた 2.6 kb DNA 断片を、多コピーベクター YEp24 (Parent *et al.* 1985) の *Sa*II-*Sma*I 間隙に挿入して構築した。*PH087* 遺伝子のクローニングには、磯野克巳教授 (神戸大学、理学部) より分譲を受けた *S. cerevisiae* の整列クローンバンク (Yoshikawa and Isono 1990) の中から、後述のように、四分子分析結果より示唆された *PH087* 遺伝子存在領域に該当するファージクローンより回収した酵母染色体 DNA を用いた。

使用培地と培養方法

ヒ酸完全培地は、YPAD 培地を滅菌後約 50°C まで冷却してから、特に断らなければ、ヒ酸溶液 (和光純薬) を 4.5 mM となるように培地 1l に対して 0.8 ml 加えて調整した。

λファージのブランク形成用平板培地として LB 培地を用い、下層培地には 1.2%、上層培地には 0.8% の寒天を加えた。

遺伝学的解析および分子遺伝学的方法

突然変異処理 突然変異処理は Lindegren らの方法 (1965) に従った。5 ml の YPAD で一晚培養した菌株の細胞を無菌水で 1 回洗った後、3 ml のリン酸緩

衝液 (pH 8.0) に懸濁した。この懸濁液 2 ml を 8 ml のリン酸緩衝液が入った滅菌マイヤーフラスコ (100 ml 容) に加え、ethyl methanesulfonate (EMS; Sigma) を 0.3 ml 添加し、30°C でゆっくり振とうした。生存率が 20-30% のところで集菌し、無菌水で 4 回洗浄後、適当量の無菌水に懸濁した。この時遠心管は常に新しいものと取り替えた。この懸濁液を冷蔵庫に保存しながら、適宜希釈して、突然変異体の分離に用いた。

λファージDNAの調製 37°C で一晚培養を行った大腸菌培養液 100 μl と、 10^5 - 10^6 plaque-forming units (pfu) のファージを含む 100 μl の SM 緩衝液 [0.1 M NaCl, 8 mM MgSO₄, 0.01% (W/V) ゼラチン, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)] を混合した後、3 ml の上層培地を加え、LB 寒天平板培地に広げた。培地が固化した後、培地面を上にしてラップで包み、37°C で 6・7 時間保温した。溶菌を確認した後、上層培地を 5 ml の SM 緩衝液で覆い、数滴のクロロホルムを加え、4°C で一晚プレートを水平に保った。この SM 緩衝液を回収してファージ液とした。ファージ DNA の調製は、得られたファージ液に対して 3,000 rpm 10 分間遠心分離を行い、上澄液に DNase I および RNase A を、それぞれ最終濃度 1 μg / μl となるように加え、37°C で 30 分保温した。上澄液の 1/2 量の PEG 溶液 (27% PEG6000, 3.3 M NaCl) を加えて水中に 1-2 時間放置した後、10,000 rpm 20 分間遠心分離を行い、上澄液を取り除いた。沈澱を 0.5 ml の SM 緩衝液に溶解し、エッペンドルフチューブに移した。この溶液を 12,000 rpm 2 分間遠心分離を行った後、上澄液に 10% SDS 溶液 5 μl と 0.5 M EDTA (pH 8.0) 溶液 5 μl を加え 68°C で 15 分間保温した。フェノール処理を 2 回、フェノールクロロホルムイソアミルアルコール処理を 2 回行った後、エタノール沈澱処理により DNA を精製した後、50 μl TE 緩衝液に溶解し、以後 DNA 溶液として用いた。

生化学的方法

ヒ酸に対する感受性の測定 YPAD 培地で 30°C 一晚培養の菌体を適当に希釈し、種々の濃度のヒ酸を添加した YPAD 寒天上に塗布した。30°C で 3-5 日間培養を行い、増殖してきたコロニーの数を、ヒ酸を添加しない YPAD 培地で増殖するコロニー数に対する割合を求め、その値をその濃度における生残率とした。

Table 3. *S. cerevisiae* strains used

Strains	Genotype ^a
AX-66-10D	<i>MATa pho3-1 leu2 ura3 lys1</i>
F16C	<i>MATα pho3-1</i>
KYC163	<i>MATa pho3-1 pho84-1 arg6 his6</i>
KYC164	<i>MATα pho3-1 pho84-1 trp1</i>
P143-3A	<i>MATa pho3-1 pho2-1 arg6</i>
P144-2D	<i>MATα pho3-1 pho4-1 arg6</i>
P145-2B	<i>MATα pho3-1 pho81-1 arg6</i>
O106-M30	<i>MATa pho3-1 PH081^c-1 gal4 his5 leu1</i>
P146-8B	<i>MATα pho3-1 pho80-1 arg6</i>
NS101	<i>MATa pho3-1 pho84-2 leu2 lys1 ura3</i>
NS102	<i>MATa pho3-1 pho84-3 leu2 lys1 ura3</i>
NS104	<i>MATa pho3-1 pho86 pho87 leu2 lys1 ura3</i>
NS105	<i>MATa pho3-1 pho84-4 leu2 lys1 ura3</i>
NS106	<i>MATa pho3-1 pho84-5 leu2 lys1 ura3</i>
NS204	<i>MATa pho3-1 pho87-1 leu2 lys1</i>
NS205	<i>MATα pho3-1 pho86-1 ura3</i>
NS213	<i>MATa pho3-1 pho86-1 pho87-1 leu2</i>
NS214	<i>MATa pho3-1 pho86-1 pho87-1 leu2</i>
NS215	<i>MATα pho3-1 pho86-1 ura3</i>
MB181	<i>MATa pho3-1 pho86-1 pho87-1 leu2</i>
SH1547	<i>MATα pho3-1 pho81-1 pho84-1 trp1</i>
MB126	<i>MATα pho2::LEU2 pho84-1 his leu2</i>
MB144	<i>MATα pho3-1 leu2 ura pho80::his3 pho84-1</i>
MB158	<i>MATα pho4-1 pho84-1 leu2 his</i>
MB247	<i>MATa pho3-1 pho87-1 leu2</i>
MB248	<i>MATα pho3-1 leu2</i>

MB249 *MAT α pho3-1 pho86-1 lys2 ura3*
MB250 *MAT α pho3-1 pho86-1 pho87-1 lys2 ura3*

* The genetic symbols used are as described by Mortimer *et al.* (1989).

第3節 結果

第1項 *pho84* 変異株はヒ酸存在下で生育できる

今までの研究により、*pho84* 変異株は他の *pho* 変異株とは異なり、リン酸取り込み活性が極度に低下していることがわかっている (Ueda and Oshima, 1975)。もし、*pho84* 変異株がリン酸と同様にヒ酸に対する取り込み活性が低下しているならば、ヒ酸耐性表現型を示すと考えられる。そこで野生型株 P-28-24C および各種 *pho* 変異株、KYC164 株 (*pho84-1*), P143-3A 株 (*pho2-1*), P144-2D 株 (*pho4-1*), P145-2B 株 (*pho81-1*), O106-M30 株 (*PHO81^c-1*), P146-8B 株 (*pho80*)を種々の濃度のヒ酸を添加した YPAD 培地で増殖させた。その結果、KYC164 株 (*pho84-1*)以外は、ヒ酸濃度が 4.5 mM の YPAD培地では増殖できなかった (図9)。ヒ酸耐性表現型が *pho84* 変異に原因することを確かめるために、KYC164 株 (*pho84*) と AX66-10D 株 (*PHO84⁺*) を交雑し、得られた二倍体を孢子形成させて四分子分析に供した。その結果、30ヶの子囊についてYPAD 培地における rAPase 生産構成性表現型とヒ酸耐性表現型が共分離することを認めた。以上の結果より、ヒ酸耐性表現型は *pho84* 変異によって引き起こされていると結論した。

第2項 ヒ酸耐性変異株の分離と遺伝解析

pho84 変異株がヒ酸耐性表現型を示したことより、リン酸取り込み系に関与する新しい遺伝子の取得を目的として、ヒ酸耐性変異株の分離を行った。EMS 変異処理を行った AX66-10D 株の細胞 10^4 個を、4 mM のヒ酸を含む YPAD 寒天上に塗布し、30℃ で 5~7 日間培養したところ、約 200ヶのコロニーが出現した。それらに対して、YPAD 培地上で rAPase についての活性染色を行ったところ、6 株から rAPase 活性が認められた。ここで得られた菌株をそれぞれ NS101~NS106

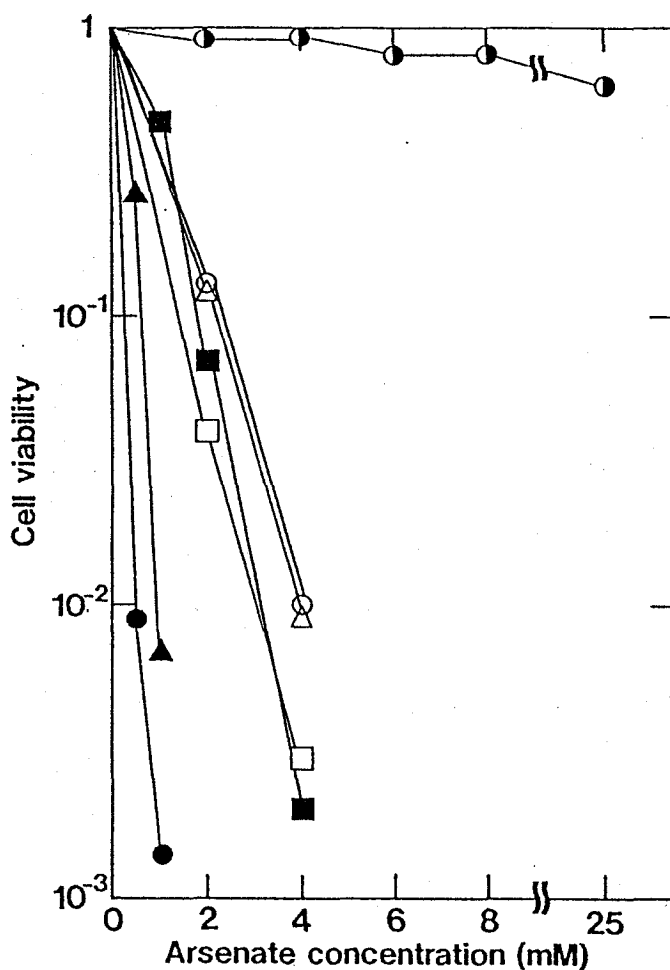


Fig. 9. Arsenate sensitivities of various *pho* mutants. Survival fractions after incubation on YPAD medium containing various concentration of arsenate were counted after 5 to 7 days of incubation at 30°C. Strains, genotypes and symbols: ■, P-28-24C (wild type); ●, KYC164 (*pho84-1*); △, P143-3A (*pho2-1*); □, P144-2D (*pho4-1*); ○, P145-2B (*pho81-1*); ●, O106-M30 (*PHO81^C-1*); ▲, P146-8B (*pho80-1*).

と命名した。この 6 株を反対の接合型を持つ野生型株 F16C と交雑し、得られた二倍体を孢子形成させ四分子分析を行った。その結果、NS104 と F16C の交雑により得られた二倍体以外、調べた 4~7ヶの子囊すべてが 2 rAPase⁺:2 rAPase⁻ 分離することを認めた。NS104 x F16C 間の雑種二倍体由来の 19ヶの子囊について、YPAD 培地における rAPase 活性を調べた結果、2 個が 2 rAPase⁺:2 rAPase⁻, 15個が 1 rAPase⁺:3 rAPase⁻, 2個が 0 rAPase⁺:4 rAPase⁻ の分離を示した。これらの結果より NS101, NS102, NS103, NS105, NS106 の 5 変異株ではそれぞれ単一の核性変異を持ち、NS104 には少なくとも 2 つ以上の連鎖しない核性変異が存在することがわかった。これらの変異の *pho84* 変異との対応を調べるために、KYC164 株 (*pho84-1*) との交雑二倍体の YPAD 培地における rAPase 活性を染色法により調べた結果、NS104 株を除く全ての株は *pho84* 変異を相補することができなかった。この事より、これら NS104 株を除く 5 変異株では *pho84* 変異によりヒ酸耐性表現型が生じており、NS104 株では *pho84* 変異以外の変異によることがわかった。

NS104 株に存在する変異数を決定するために、NS104 株と F16C 株間の雑種二倍体 NS30 株の子囊より、YPAD 培地上で 0 rAPase⁺: 4 rAPase⁻ の分離を示す子囊を選抜し、以後の解析を行った。0 rAPase⁺: 4 rAPase⁻ の分離を示す NS30 株の 4 個の減数分裂分離株の、それぞれを NS104 株の解析途上で得られた rAPase 構成性表現型を示す NS213 株 (*MATa*)、または MB182 株 (*MATα*) と交雑して得た二倍体を四分子分析に供した。もし、YPAD 培地で rAPase 非生産性表現型を示した子囊由来の減数分裂分離株が、それぞれ単一変異を持つならば、YPAD 培地での rAPase 活性はすべて 2 rAPase⁺: 2 rAPase⁻ に分離するはずである。そこで、これら 4 つの二倍体を四分子分析に供した結果、それぞれ 6~16ヶの子囊について、すべてが 2 rAPase⁺:2 rAPase⁻ の分離を示すことを認めた。この事より、変異株 NS104 には 2 つの核性変異が存在し、それらが、ヒ酸耐性および rAPase 構成性表現型を引き起こしていると結論した。また先の 0 rAPase⁺: 4 rAPase⁻を示す四分子より、接合型が相補的な分離株 2 株 (NS204 および NS205) を選び、それらの間で雑種二倍体を作成し、孢子形成させた後、四分子分析を行った。得られた 8ヶの子囊は 3 個が 2 rAPase⁺: 2 rAPase⁻, 4 個が 1 rAPase⁺: 3 rAPase⁻, 1個が 0 rAPase⁺: 4 rAPase⁻ の分離比を示した。このよ

うに NS204 株と NS205 株の雑種二倍体より、rAPase 構成性表現型を示す減数分裂分離株が得られたことより、NS204 株と NS205 株には異なる変異が存在する事がわかった。そこで、NS205 株にある変異を *pho86-1* 変異、NS204 株にある変異を *pho87-1* 変異と命名した。

第3項 *pho86 pho87* 二重変異株の表現型

先に述べたように、*pho86 pho87* 二重変異株は *pho84* 変異株と同じく、4 mM のヒ酸を含む YPAD 培地で増殖することができる。そこで、NS213 株 (*pho86 pho87*)、NS205 株 (*pho86*)、NS204 株 (*pho87*) におけるヒ酸耐性を図9と同様にして調べた。その結果、二重変異株は *pho84* 変異株と同じく 25 mM のヒ酸が含まれる YPAD 培地でも増殖することができた (図10)。*pho86* 変異株は野生株よりヒ酸耐性度が高いが、*pho87* 変異株は野生株とほとんど変わらない (図10)。このことから、二重変異株のヒ酸耐性表現型については、*pho86* 変異の寄与の方が *pho87* 変異よりも大きいと考えられる。*pho84* 変異株では、rAPase 産生構成性、ヒ酸耐性表現型に加えて、リン酸の取り込み活性が大きく減少する。そこで *pho86*、*pho87*、*pho86 pho87* 変異株における、リン酸の取り込み活性を測定した。その結果、*pho86* 変異を有する MB249 株 (*pho86*) および MB250 株 (*pho86 pho87*) のリン酸取り込み活性が、野生型に比べて約 1/20 に低下していた (図11)。しかし、MB246 株 (*pho87*) は野生株と変わらなかった。これらのことから、*PHO86* 遺伝子産物がリン酸取り込みに対して重要な働きをしているが、ヒ酸耐性および rAPase 産生構成性表現型を引き起こすには、*pho86* 変異と *pho87* 変異の両方が必要であることがわかった。

第4項 *pho86 pho87* 変異株における *PHO84* 遺伝子の発現

rAPase 産生構成性表現型を示す *pho86 pho87* 二重変異株における *PHO84* 遺伝子の発現を調べた。NS213 株 (*pho86 pho87*) と P-28-24C 株 (*PHO86 PHO87*) を低リン酸または高リン酸完全培地で 12~16 時間培養の後、得られた菌体より抽出した全 RNA に対して、*PHO84* 遺伝子 ORF の一部である 564 bp *BgIII-XhoI* DNA 断片をプローブとしてノザン解析を行った (図12)。その結果、高リン酸条件下で培養を行った野生株から抽出した RNA では、プローブとの結合シグナルは検

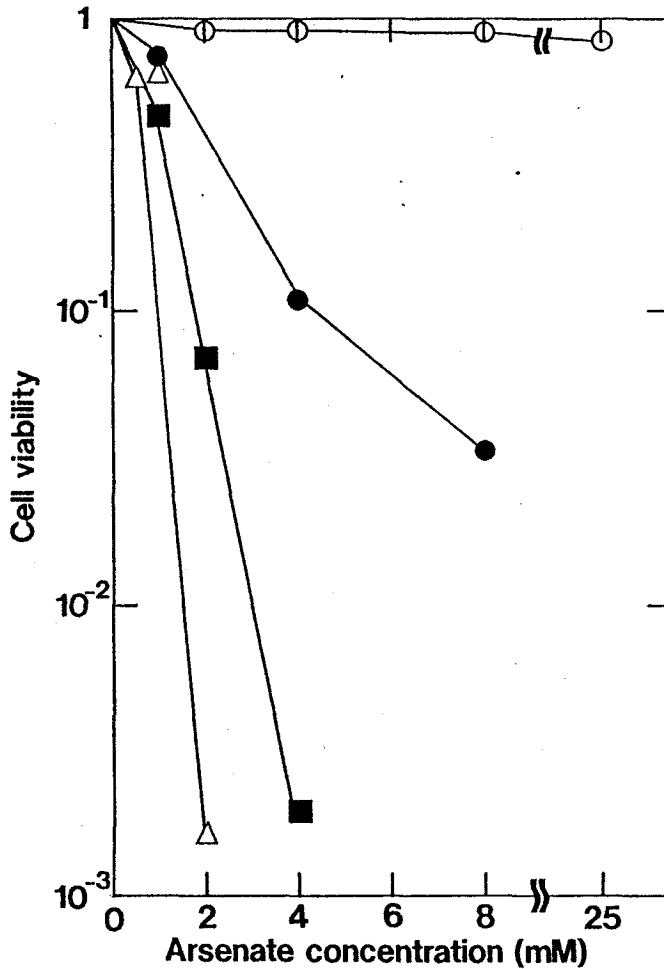


Fig. 10. Arsenate sensitivities of pho86 pho87 mutant. Survival fractions after inoculation on YPAD medium containing various concentration of arsenate. Surviving colonies were counted after five to seven days of inoculation at 30°C. Strains and symbols:■, P-28-24C (PHO86⁺ PHO87⁺); ●, NS205 (pho86 PHO87⁺); Δ, NS204 (PHO86⁺ pho87); ○, NS213 (pho86 pho87).

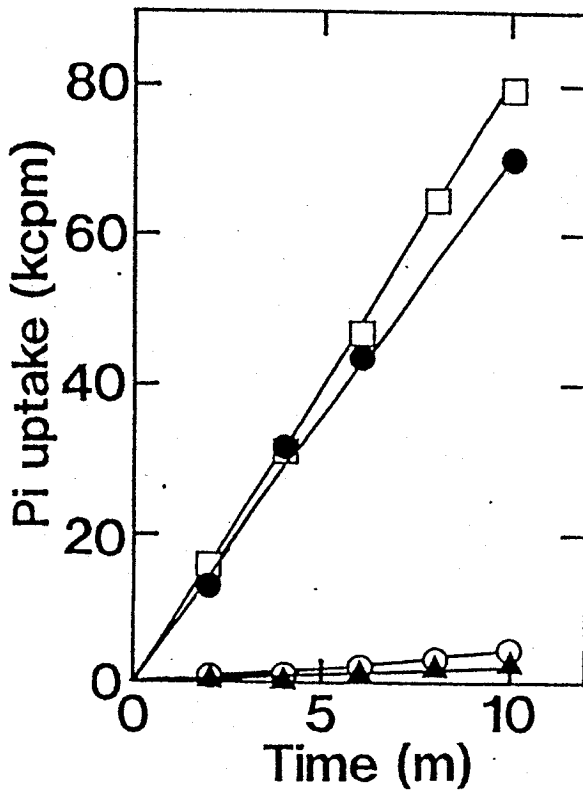


Fig. 11. Pi uptake by cells of the pho86 pho87 double mutant. Cells were shaken at 30°C in nutrient low-Pi medium. The cells were collected when cell growth reached OD₆₆₀ of 1.0, washed and inoculated into synthetic low-Pi medium at a cell concentration giving an OD₆₆₀ of 0.1. The radioactivity of the medium was adjusted to 8.6×10^5 cpm per ml with $^{32}\text{P}_i$. The amount of Pi absorbed by the cells was expressed as cpm of ^{32}P radio-activity per ml of cell suspension of OD₆₆₀ = 0.1. Strains, genotypes and symbols: ●, MB248 (PHO86⁺ PHO87⁺); □, MB247 (PHO86⁺ pho87); ○, MB249 (pho86-1 PHO87⁺); ▲, MB250 (pho86-1 pho87-1).



Fig. 12. Detection of PHO84 transcript in the wild type and pho86 pho87 mutant by Northern hybridization. Samples of $10\mu\text{g}$ of total RNAs prepared from cells of strains P-28-24C (PHO86⁺ PHO87⁺ [WT]; lanes 1 and 2), and NS213 (pho86 pho87; lane 3 and 4) grown on nutrient high-P_i (lane 1 and 3) or low-P_i (lanes 2 and 4) medium were charged in slots. The ³²P-labeled 564-bp BglIII-XhoI fragment of PHO84 DNA and a 1.0-kb HindIII-XhoI fragment of S. cerevisiae encoding the ACT1 gene were used as probes for detection of the PHO84 and ACT1 transcript, respectively. The specific activities of probes were 1.0×10^8 cpm per μg of DNA. 25S and 18S rRNAs visualized by staining with ethidium bromide were used as size markers as described by Philippsen et al. (1978).

出されなかったが、*pho86 pho87* 変異株では高リン酸条件下においても *PHO84* mRNA が検出された。*pho86 pho87* 二重変異株ではリン酸取り込み活性は低下しているにもかかわらず *PHO84* mRNA が構成的に生産されていることより、*PHO86* と *PHO87* 両遺伝子は *PHO84* 遺伝子の翻訳以降の段階に関与していると考えられる。

第5項 *pho86 pho87* 変異株の rAPase 構成性表現型は *PHO84* 多コピープラスミドにより相補される *pho86 pho87* 変異株と *pho84* 変異株とが同じ表現型を示すことより、*pho86 pho87* 変異表現型に対する *PHO84* 遺伝子を持つプラスミドの影響を調べた。NS213 株 (*pho86 pho87 ura3*) に *PHO84* プラスミドを担う低コピープラスミド p373 (図1) を導入し、得られた Ura⁺ 形質転換体の中の任意の 4 株について rAPase 産生表現型を活性染色法により調べたが、NS213 株との違いはみられなかった。次に、同じ遺伝子を多コピープラスミド YEp24 に結合した雑種プラスミド pAC613 を NS213 株に導入して得た形質転換株の中から、同じく 4 株について rAPase 産生表現型を調べたところ、すべて rAPase 抑制性の表現型を示した。*PHO84* 遺伝子上流には Pho4 タンパク質結合領域が 5ヶ所存在するが、この現象がプラスミド上のその領域に細胞内の Pho4 タンパク質が結合し、ゲノムの *PHO5* 遺伝子に結合する Pho4 タンパク質数が減ったためである可能性を調べるため、同じプラスミドを rAPase 産生構成性表現型を示す NBD80-1 株 (*pho80*), NBD82-1 株 (*PHO81⁺*) に導入し、得られた株の rAPase 産生表現型を調べた。その結果、いずれの株も、すべて rAPase 構成性を示し表現型に変化は認められなかった。このことより、*PHO84* 多コピープラスミドを導入した *pho86 pho87* 二重変異株において、ゲノム上の *PHO5* 遺伝子に結合する Pho4 タンパク質が大きく減少したとは考えにくい。以上の結果から、*PHO84* 遺伝子の供与量を多くすれば、*pho86 pho87* 変異表現型が相補されると結論した。

第6項 *pho87* 遺伝子のマッピングとクローニング

これまでの遺伝解析結果を総合して、*pho87* 遺伝子座が *MAT* 遺伝子座に非常に強く連鎖することがわかった。NS214 株 (*MATa pho86-1 pho87-1*) と NS215 株 (*MATα pho86-1*) を交雑して得た二倍体を孢子形成させ、四分子分析に供した結果、調べた 38 個の子嚢すべてにおいて、rAPase 構成性株はと a 接合型を示し

た。この結果、Perkins (1943) の式より、第 III 番染色体上での *pho87* と *MATa* との距離は、1.3 センチモルガン以内と計算された。

PHO87 遺伝子座が存在する第 III 番染色体については、整列ファージクローンバンクがすでに構築されているので (Yoshikawa and Isono 1990)、*MAT* 遺伝子座近傍の領域を持つファージクローンを利用して *PHO87* 遺伝子のクローニングを行った。バクテリオファージλベクターである EMBL4 の *Bam*HI 部位に、*S. cerevisiae* の第 III 番染色体を *Sau*3AI で部分消化を行った DNA 断片を挿入して作製した整列クローンバンク (Yoshikawa and Isono 1990) の中から、*MAT* 座近傍の遺伝子を含むファージクローンより酵母DNAを調製し、プラスミドベクター YCp50 を用いてサブクローニングを行い、種々のプラスミドを作製した (図13)。これらのプラスミドを MB181 株 (*pho86 pho87*) に導入し、rAPase 構成性表現型に対する抑圧能を調べた。その結果、4.7 kb *Eco*RI-*Eco*RV DNA 断片が *pho86 pho87* 変異表現型を相補することがわかった。すでにこの領域は、塩基配列が決定されており (Chant *et al.* 1991; Ray *et al.* 1991; Thierry *et al.* 1990)、*YCR524* と命名される 2769 bp の ORF が 見いだされている (Thierry *et al.* 1990)。*PHO87/YCR524* 遺伝子の塩基配列より推定されるタンパク質の N 末端部からおよそ 400 個のアミノ酸には、電荷のあるアミノ酸残基が多く存在した。それに続く領域には、疎水性と親水性のアミノ酸が繰り返し配列している。これは、膜タンパク質にしばしば見られる構造であり (Eisenberg 1984)、Pho87 タンパク質の C 末端部が膜に埋め込まれていることが示唆された。

第7項 *pho84* 変異とホスファターゼ生産調節系遺伝子変異との二重変異株の表現型 これまでに *pho84* 変異株でも、*pho4* あるいは *pho81* 変異が存在すれば rAPase 非生産性表現型を示し、*pho80 pho84* および *pho85 pho84* 二重変異株は、*pho84* 変異株と同じく構成性を示すことが知られていた (Ueda *et al.* 1975)。しかし、ヒ酸に対する表現型については不明であったので、*pho84* 変異と種々の *pho* 変異との二重変異株における 4 mM のヒ酸を含む YPAD 培地での生育能を調べた。MB126 株 (*pho81 pho84*)、MB158 株 (*pho4 pho84*)、MB144 株 (*pho80 pho84*)、SH1547 株 (*pho81 pho84*) をヒ酸培地に塗布し、5 日間、30°C で保温した。その結果、MB126 株、MB158 株、SH1547 株は生育せず、MB144 株だけが増殖

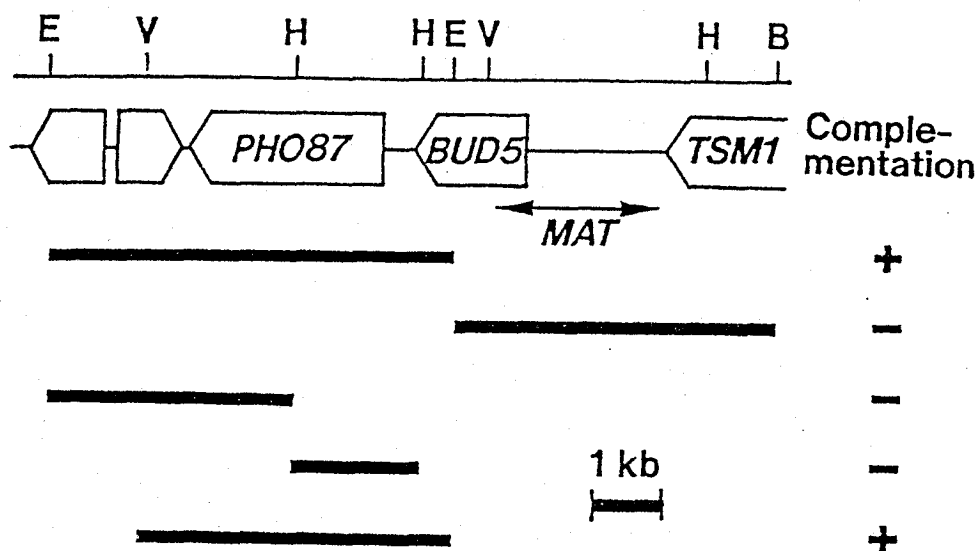


Fig. 13. Restriction map of the *PHO87/YCR524* locus and flanking region, and the abilities to complement the rAPase constitutive phenotype of a *pho86 pho87* double mutant, NS213. Open arrows indicate the approximate position and direction of ORFs. The thick lines indicate yeast DNA fragments on the relevant YCp50 vectors. The symbols + and - indicate, respectively, ability and inability of the plasmid to complement the *pho86 pho87* mutant phenotype. Abbreviations of restriction sites: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; V, *Eco*RV.

できた。つまり、rAPase 非生産性およびヒ酸感受性表現型を示す *pho2*, *pho4*, *pho81* 変異は、ヒ酸耐性表現型に関しても *pho84* 変異に対して上位にあり、ヒ酸感受性となっている。これらの結果より、ヒ酸感受性を示した二重変異株では、ヒ酸が再び取り込まれるようになったか、またはヒ酸に対する解毒作用が失われた可能性が考えられた。

第4節 考察

リン酸輸送体をコードすると考えられる *PHO84* 遺伝子の変異株ではリン酸のアナログであるヒ酸に対して耐性表現型を示すことを明らかにした。この現象は、*pho84* 変異株において、リン酸の取り込み活性が低下する (Ueda and Oshima 1975) のと同様に、ヒ酸に対しても取り込み活性が低下することを示唆している。ヒ酸耐性表現型は、リン酸取り込み活性に対する一つの指標となると考えられた。そこで、リン酸取り込みに関与する新しい遺伝子を取得する目的で、ヒ酸耐性でしかも rAPase 構成性となる変異株を分離した。その結果、*pho84* 変異に加え、これまでの *pho* 変異いずれとも異なる *pho86 pho87* 二重変異でそのような表現型を生じる株が得られた。この変異株の他の表現型を調べたところ、低リン酸条件下におけるリン酸取り込みに対する脱抑制能が、*pho84* 変異株と同じく、野生型株に比べて大きく低下していた。さらに *pho86 pho87* 二重変異株の rAPase 構成性表現型が *PHO84* を持つ多コピープラスミドにより相補されることより、*PHO86* および *PHO87* 遺伝子産物はリン酸の取り込みに関与すると考えられた。しかし、*pho86 pho87* 変異株で、*PHO84* 遺伝子の転写産物は低リン酸条件下だけでなく、高リン酸条件下においても検出された。このことはリン酸取り込み活性が低下した原因が、*PHO84* 遺伝子の転写が行われないためではないことを示している。Pho86 タンパク質と Pho87 タンパク質が関与するリン酸取り込み系と Pho84 リン酸輸送体によるリン酸取り込み系とが独立に働くとすれば、それぞれの変異株におけるリン酸取り込み活性の低下は、加算的になると考えられる。従って、*pho86 pho87* 遺伝子産物はリン酸取り込み系に対して *PHO84* 遺伝子の転写以後あるいは Pho84 タンパク質と協調して機能していると考えられる。*PHO84*, *PHO86*, *PHO87* 遺伝子産物が協調してリン酸を取り込むとすれば、いずれの遺伝子

の変異によっても、リン酸取り込み活性は低下するであろう。しかし、*PHO84* 遺伝子のコピー数を上昇させれば、*pho86 pho87* 変異表現型が抑圧されることから、*Pho84*, *Pho86*, *Pho87* タンパク質がリン酸の取り込みにおいて等価な役割をしているというより、むしろ、*Pho84* タンパク質が中心的な役割をしていると考えられる。バナジン酸もリン酸のアナログで、細胞内ではリン酸と拮抗的に働くと考えられているため (Nechay 1984)、いくつかの生物においてリン酸代謝に関与する因子を同定する目的でその耐性変異株が取得されている。例えば、*N. crassa* では高親和性リン酸取り込み系が欠損した株がバナジン酸耐性株として得られている (Bowman *et al.* 1983)。*S. cerevisiae* においても、すでにバナジン酸耐性変異株が取得されている (Willisky *et al.* 1985; Kanik-Ennilat and Neff 1990)。しかし、リン酸取り込み活性は野生型株と変わらなかった (Willisky *et al.* 1985; Kanik-Ennilat and Neff 1990)。このことより、バナジン酸とヒ酸はいずれもリン酸のアナログではあるが、リン酸取り込み系に対する関与の仕方が異なることが示唆される。

pho84 変異と種々のホスファターゼ生産調節系遺伝子変異との二重変異株を作成したところ、酵素非生産性表現型を示す *pho2*, *pho4*, *pho81* 変異を組み合わせたときにはヒ酸感受性となり、酵素生産構成性表現型を示す *pho80* 変異を組み合わせたときにはヒ酸耐性となった。*rAPase* をコードする *PHO5* 遺伝子の変異を組み合わせた *pho5 pho84* 二重変異株はヒ酸耐性になることより、*rAPase* 生産の有無がヒ酸に対する感受性を決めるのではなく、*rAPase* 生産制御に関与する遺伝子が *pho84* 変異存在下で、ヒ酸感受性表現型を引き起こすことがわかった。*pho2*, *pho4*, *pho81* 変異により *pho84* 変異のヒ酸耐性表現型が抑圧される理由として、i) 変異により *Pho84* 以外のリン酸取り込み系が働くようになり、その系を通してヒ酸が取り込まれて感受性となった。ii) *PHO* 系遺伝子はヒ酸の排出系に関与しており、変異により *pho84* 変異株においてもわずかに取り込まれていたヒ酸に対する排出系が働かなくなり、ヒ酸が蓄積したため感受性になった。iii) *PHO* 系遺伝子産物にはヒ酸を何らかの方法で解毒する作用があり、その解毒作用が変異により失われて感受性となった、などの可能性が考えられる。これまでの解析より、*PHO2*, *PHO4* 遺伝子は低レベルで構成性の発現をしており (Yoshida *et al.* 1989a)、*PHO81* 遺伝子は *PHO* 系の構造遺伝子である *PHO5*, *PHO8*, *PHO84* 遺伝子

と同じく、培地中のリン酸濃度が低いときに転写レベルで脱抑制されることがわかっている (Yoshida *et al.* 1989b)。Yoshida ら (1989b) による遺伝子供与量効果の実験結果から、転写正因子である Pho4 タンパク質と負因子である Pho80 タンパク質との間には、タンパク質間の直接の相互作用の存在が示唆されているが、Pho81 タンパク質と Pho80 タンパク質間には直接の相互作用がないと考えられている。以上の事実より Pho81 タンパク質が Pho2 タンパク質や Pho4 タンパク質とは異なり、酵素として機能し、ヒ酸に対する感受性表現型が *PHO81* 遺伝子が発現されなくなることにより、引き起こされる可能性が示唆される。

第5節 要約

S. cerevisiae のリン酸取り込み系に関与する遺伝子を同定するため、ヒ酸耐性変異株を取得し、遺伝解析を行った。リン酸輸送体をコードすると考えられる *PHO84* 遺伝子の変異株がヒ酸耐性表現型を示すことを見いだした。そこで、リン酸取り込みに関与する新たな遺伝子を取得することを目的として、ヒ酸耐性と rAPase 構成性表現型を同時に示す変異株を分離した。遺伝解析の結果、上記の表現型を引き起こす新しい *pho86 pho87* 二重変異株を見いだした。二重変異株では *PHO5* と *PHO84* 遺伝子の転写が構成的であり、脱抑制条件下における無機リン酸取り込み活性が著しく低下していた。また、*pho86 pho87* 変異株の表現型は *PHO84* 遺伝子を持つ多コピープラスミドにより相補された。*PHO87* 遺伝子座は第III番染色体右腕の *MAT* 遺伝子座のごく近傍に存在し、*YCR524* と報告されていた。その塩基配列より推定されるアミノ酸配列より、Pho87 タンパク質は膜に存在することが示唆された。また、*pho2*, *pho4*, *pho81* 変異と *pho84* 変異の二重変異株では、*pho84* 変異株のヒ酸耐性表現型が抑圧され、感受性を示したことより、i) *PHO81* 遺伝子産物が Pho84 以外のリン酸取り込み系に対して負に働いている ii) *PHO81* 遺伝子産物がヒ酸またはその代謝物に対して解毒作用を持っている、などの可能性が考えられた。

第3章 *pho84*変異株のrAPase 構成性表現型を抑圧する*sef*変 異の分離と性格付け

第1節 緒言

細胞にとってリン酸を取り込むことは基本的なプロセスである。酵母では、少なくとも2つの経路からリン酸が取り込まれることが知られている (Tamai *et al.* 1985)。複数の取り込み系が存在する意義は、外界のリン酸濃度に応じて、効率よくリン酸を取り込むためと考えられる。一般に、ある調節系に関与する遺伝子を見いだすための遺伝学的手法の一つとして、既存の変異株の変異表現型に対する抑圧変異の単離が試みられる。たとえば、カリウムの輸送体をコードする *TRK1* 遺伝子 (Gaber *et al.* 1988) の変異株では、カリウム濃度が低い培地での増殖不能表現型を示す事を利用して、それより増殖能を回復させた復帰変異株を分離した結果、その中には低親和性のカリウム輸送体をコードする遺伝子上の変異が含まれていた (Vidal *et al.* 1990)。

本章では、こうしたアプローチを用いてリン酸取り込み系に関与する遺伝子を取得するため、*pho84* 変異株の rAPase 生産構成性表現型を抑制性にする復帰変異を分離し、解析を行った。その結果、得られた復帰変異 (*sef*変異; supressor of *pho eighty four*) 株の中に、細胞増殖および胞子形成に異常を示す株を見いだした。さらに、そのような変異の一つである *sef4* 変異は *PHO81* 遺伝子の変異アレルであることがわかった。また、rAPase 非生産性表現型を引き起こす rAPase 生産調節遺伝子の変異である *pho2*, *pho4*, *pho81* 変異と *pho84* 変異との二重変異株がヒ酸感受性になる事を認めた。

第2節 実験材料および実験方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第1章において記述した以外の内容について記述した。

供試菌株とプラスミド

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表4 に示した。pUC19 (Yanish-Perron *et al.* 1985) の *Xba*I 間隙に *SEF3* 遺伝子の一部を含む 1.7 kb *Xba*I DNA 断片を挿入して作製したプラスミドを p318 と命名した。*SEF3* 遺伝子の転写産物を同定するためのプローブとして用いた pMB3 は、p318 を *Hind*III で部分分解し、*SEF3* 遺伝子上の *Hind*III 部位で 1ヶ所だけ切断した DNA 断片に、YE24 より調製した *URA3* 遺伝子 1.2 kb *Hind*III DNA 断片を連結して構築した (図16)。*PHO81* 遺伝子多コピープラスミドとしては吉田が構築した pAC4-LB2 を用いた (吉田和哉, 大阪大学工学部博士論文, 1989)。

pho84-1 変異株よりの復帰突然変異株の分離

供試菌株として、KYC163 株 (*MATa pho3-1 pho84-1 his6 arg6*)、KYC164 株 (*MATα pho3-1 pho84-1 trp1*) を使用し、*pho84-1* 変異を抑圧する復帰突然変異株を独立に分離するため、それぞれの株を 2 ml の YPAD 液体培地に植菌し、30 °C で 1 日培養を行った後、適当に希釈して YPAD 平板培地上に広げ、コロニーを出現させた。出現したコロニーに対して rAPase 活性染色を行い、*pho84* 変異株の表現型である YPAD 培地上での rAPase 生産性陽性株を平板培地から直接分離した。次に分離した *pho84* 変異クローン 1 クローンにつき 1 枚の YPAD 培地を使って、それぞれ 500-800 のコロニーを形成させた。これらの中から、rAPase 活性が抑制性を示すコロニー、すなわち *pho84* 変異株の rAPase 構成性表現型が抑圧されたクローンを、各 1 枚のプレートから 1 株だけ分離した。これらの分離株は、必要に応じてさらに YPAD 平板培養を重ねて純化した。

第3節 結果

第1項 *pho84-1* 変異株よりのホスファターゼ生産性が抑制性となった変異株 (*sef*) の分離と遺伝解析 *S. cerevisiae* の *pho84* 変異株は高リン酸培地上でも rAPase 活性を示すが、これより rAPase 非生産性となる突然変異クローンが高頻度に出現する。*PHO84* 遺伝子と機能的に関連する遺伝子の分離を目的として、KYC164 株 (*pho84-1*) から実験方法の項で述べた手順により、YPAD 培地上で

Table 4. *S. cerevisiae* used

Strain	Genotype*
NS139	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef1-1 trp1</i>
NS140	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef2-1 trp1</i>
NS156	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef3-1 trp1</i>
NS118	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef4-1 arg6 his6</i>
NS122	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef5-1 arg6 his6</i>
NS123	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef6-1 arg6 his6</i>
NS134	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef7-1 arg6 his6</i>
SH1029	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef3-1 leu2-3,112 trp1 ura3-52</i>
SH1547	<i>MATα pho3-1 pho81-1 pho84-1 trp1</i>
NS157	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef4-1 arg6 his6</i>
NS158	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef5-1 arg6 trp1</i>
NS159	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef6-1 arg6 trp1</i>
NS162	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef1-1 arg6 his6</i>
NS163	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef2-1 his6</i>
NS164	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef3-1 his6</i>
NS223	<i>MATα pho3-1 pho84-1 sef7-1 arg6 his6</i>
SH964	<i>MATα ade2-101 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52</i>
EMB1	<i>MATα pho3-1 PHO81^c ade2 his3 leu2 ura3</i>
MB72	<i>MATα pho3-1 sef4 his4 or/and his6 trp1</i>
MB83	<i>MATα pho84-1 sef4-1 leu2</i>

* The genetic symbols used are as described by Mortimer *et al.* (1989).

pho84 変異の rAPase 陽性表現型を抑圧する変異株をそれぞれ 4 株と 3 株分離し、Sef (suppressor of pho eighty four) と命名した。これらはすべて、低リン酸培地上では rAPase 活性を示した。

優性劣性試験を行うため、それぞれの *sef* 突然変異株と、接合型が反対で *pho84-1* 変異を持つ KYC163 株または KYC164 株との雑種二倍体のコロニーに対して、YPAD 培地上での rAPase 活性を調べた。もし、交雑株が rAPase を産生していれば *sef* 変異は劣性であり、産生しなければ *SEF* 変異は優性である。活性染色の結果、すべての交雑株が rAPase 生産性表現型を示すことから、得られた *sef* 変異はすべて劣性変異である事がわかった。次に、この交雑株を四分子分析に供し、活性染色によって、高リン酸培地で 2 rAPase⁻:2 rAPase⁺ の分離を示したので、取得した *sef* 変異はすべて一遺伝子変異であることがわかった。さらに 7 株すべての *sef* 変異株について相補性試験および組み換え試験を行った。相補性試験では、接合型の異なる *sef* 変異株を互いに交雑し、YPAD 培地上で rAPase 活性染色を行った。問題の *sef* 変異が同じ遺伝子座にあれば、*pho84* 変異を抑圧するので、YPAD 培地上の rAPase 生産性は陰性である。異なる遺伝子座にあれば rAPase 生産性は陽性となる。しかし、すでに述べたように、*pho84* 単独変異株においても YPAD 培地上で rAPase 活性染色により染色されないことがあるため、さらに二倍体雑種を四分子分析に供し、組み換え体出現の有無によって、二つの変異が異なる遺伝子座にあることを確認した。同じ遺伝子座に起こった *sef* 変異株間の雑種からは、rAPase 活性染色により赤くなる減数分裂分離株は高頻度では出現しないはずである。組み換え試験の結果、すべての二倍体からは YPAD 培地上で rAPase 活性染色により染色される減数分裂分離株が高頻度で出現した事より、これらの *sef* 変異はすべて異なる相補群に属し、少なくとも 7 つに分かれることがわかった。しかし、*sef3*, *sef4*, *sef6* 変異以外は YPAD 培地上での rAPase 生産表現型が不安定であったので、以後の解析はこの 3 変異に対して行った。

pho84 変異株が、rAPase 生産構成性に加えて、ヒ酸耐性表現型を示すことを第 2 章で明らかにした。そこで、*pho84 sef* 二重変異株におけるヒ酸耐性表現型を調べた。上の実験で得られた *pho84 sef* 変異株をヒ酸培地に植菌し、その株のコロニー形成能を調べた結果、NS156 株 (*pho84 sef3*) および NS157 株 (*pho84 sef4*) はヒ酸感受性を示したことより、*sef3* 変異および *sef4* 変異は *pho84* 変異によるヒ酸耐性表現型を抑圧することがわかった。しかし、その他の *sef* 変異は *pho84* 変異によるヒ酸耐性表現型を抑圧することはできなかった。

sef3, *sef4*, *sef6* 変異による *pho84* 変異株の rAPase 構成性表現型に対する抑圧がアレル特異的かを調べるため、これらの変異株と *pho84-3*, *pho84-5*, *pho84-6* 変異を持つ株との二倍体雑種について四分子分析を行った。5 から 15 個の子囊について、四分子の rAPase 活性を染色法により調べたところ、YPAD 培地上では、すべて 2 rAPase⁺:2 rAPase⁻ の分離を示し、低リン酸培地上では、すべて 4 rAPase⁺:0 rAPase⁻ の分離を示した。従って、*sef3*, *sef4*, *sef6* 変異は *pho84* 変異アレルにかかわらず抑圧することが示唆された。

第2項 *sef* 変異株の多面表現型

得られた *sef* 変異株の中に、高リン酸培地中で *pho84* 変異による YPAD 培地上での rAPase 生産表現型を抑圧するだけでなく、30℃ では増殖するが 37℃ では増殖できない温度感受性増殖表現型 (Tsm⁻) を示す NS156 株 (*pho84 sef3*) および NS123 株 (*pho84 sef6*) を認めた (図14)。*sef* 変異が、この温度感受性表現型を引き起こすのかを調べるために、KYC163 株 (*pho84-1*) と NS156 株 (*pho84-1 sef3-1*) とを交雑して二倍体雑種を作成し、四分子分析を行った。その結果、調べた 15 個の子囊のすべてが 2 Tsm⁺:2 Tsm⁻ の分離を示し、しかも高リン酸培地上で rAPase 活性染色を行うと、rAPase⁻ のコロニーはすべて Tsm⁻ 表現型を示した。また、低リン酸培地上では、すべてのコロニーが rAPase⁺ の表現型を示した。すなわち、rAPase の抑制性生産表現型と Tsm⁻ 表現型が常に同じ減数分裂分離株に現れたことから、*sef3* 変異が *pho84-1* 変異の rAPase 構成性表現型に対する抑圧能と Tsm⁻ 表現型の 2 つの表現型の原因となっていると結論した。

次に、*sef3* 変異は *pho84* 変異の有無にかかわらず Tsm⁻ 表現型を引き起こす可能性を調べるために、P-28-24C 株 (*PHO84 SEF3*) と NS156 株 (*pho84-1 sef3-1*) から雑種二倍体を作成し、四分子分析を行った。もし、Tsm⁻ 表現型を示すのに、*sef3* 変異が *pho84* 変異を要求するなら、2 Tsm⁻:2 Tsm⁺ の分離以外に、1 Tsm⁻:3 Tsm⁺ や 0 Tsm⁻:4 Tsm⁺ の分離も示すはずである。しかし、調べた 12 個の子囊のすべてが 2 Tsm⁻:2 Tsm⁺ の分離を示したので、*sef3* 変異は、*pho84* 変異の rAPase 構成性表現型を抑圧するのに加えて、単独で Tsm⁻ 表現型をも示すことを認めた。

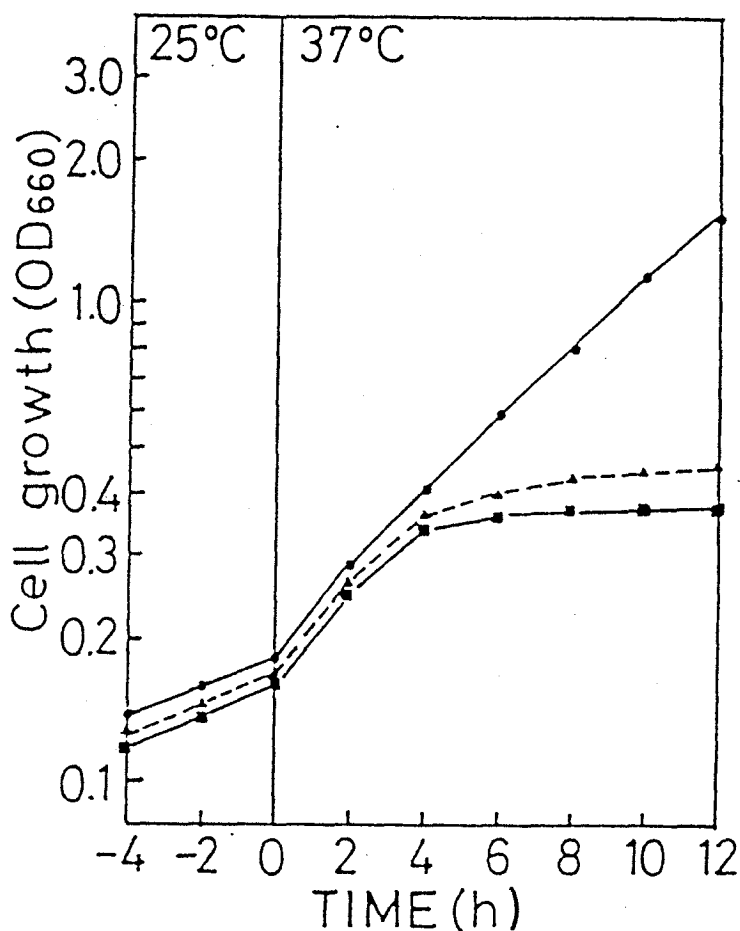


Fig. 14. Time courses of growth of the wild type strain, and sef3 and sef6 mutants. Cells were grown at 30°C for 24 h in 5 ml YPAD medium, and inoculated into 100 ml of YPAD medium to give OD₆₆₀ = ca. 0.1. The cultures were shifted from 25°C to 37°C at 0 h. Cell growth was monitored as the OD₆₆₀ of the cultures. Strains and symbols: ●, KYC164 (SEF3⁺ SEF6⁺); ▲, NS156 (sef3); ■, NS123 (sef6).

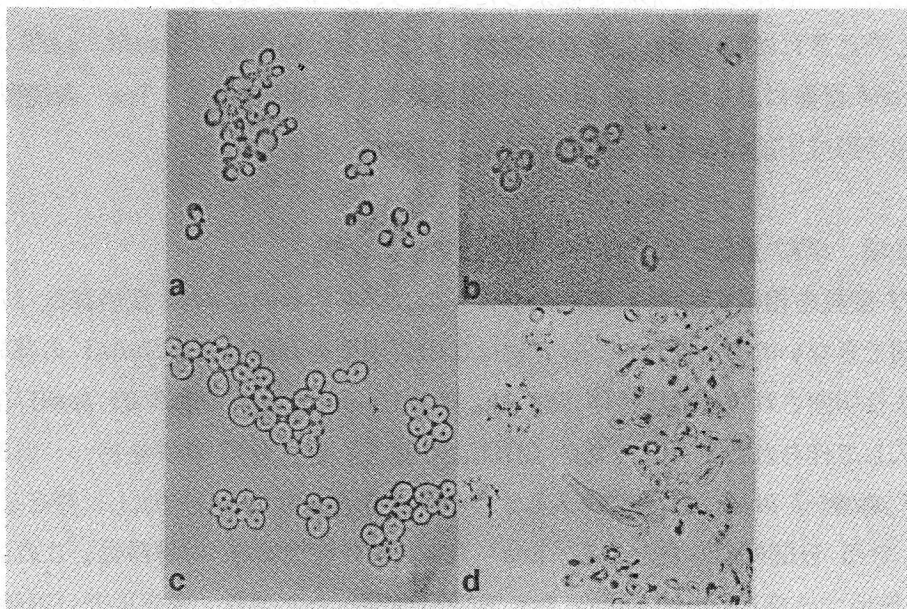


Fig. 15. Photomicrographs of cells of strains KYC164 (SEF3⁺; a and b) and NS156 (sef3; c and d). Cells were cultivated for 26 h at 25°C (a and c) or for 24 h after shift from 25°C (2h) to 37°C (b and d). All photomicrographs were taken at the same magnification.

次に、NS123 株のもつ *sef6* 抑圧変異について調べた。NS123 (*pho84-1 sef6*) x KYC164 (*pho84-1*) の交雑を行い、四分子分析に供した結果、8 個の子囊すべてが 2 Tsm⁻:2 Tsm⁺ 分離を示した。YPAD 培地上で rAPase 活性染色を行うと、染色されないコロニーは必ず Tsm⁻ であった。この結果は、*sef6* 変異は *sef3* 変異の場合と同様に、*pho84* 変異の抑圧と温度感受性増殖の 2 つの表現型を引き起こすことを示している。37°C での細胞の形態を顕微鏡で観察したところ、*sef3* 変異株ではつぶれた細胞が数多くみられた (図15d)。

さらに、*sef* 変異の胞子形成への影響を調べた。*sef* 変異がヘテロのときはいずれの組み合わせでも野生株と同頻度の胞子形成能を示した。しかし *sef* 変異を

ホモとした二倍体の孢子形成を観察したところ、*sef3* 変異および *sef6* 変異をホモとしたときには孢子形成能を認めなかった。以上の結果より、*sef3*, *sef6* 変異は *pho84* 変異による rAPase 構成性表現型に対する抑圧表現型、Tsm⁻ 表現型および孢子形成不能の多面表現型を示すことがわかった。

第3項 *SEF3* 遺伝子のクローニングとマッピング

sef3 変異を相補する DNA 断片のクローニングを行った。*sef3* 変異株は 37°C で増殖できないので、クローニングにはこの表現型を利用した。*Sau3AI* の部分消化により切断された酵母染色体 DNA を、低コピーベクター YCp50 の *Bam*HI 部位に挿入して作られたジーンバンク (ATCCより購入) を、*sef3* 変異を持つ SH1029 (*sef3 pho84-1 ura3-52*) 株に導入し、ウラシルを含まない平板培地上に塗布した。37°C で 5 日間保温したところ、Ura⁺ Tsm⁺ 形質転換体を 1 株得た。これを YPAD 培地で培養し、Ura および Tsm 表現型を調べたところ、両表現型は同時に失われることがわかった。このクローンより DNA を調製し、大腸菌 DH5 α 株に導入しアンピシリン耐性形質転換体を得た。この形質転換体よりプラスミドを調製し、これを再び SH1029 株に導入して、4 個の Ura⁺ 形質転換体の Tsm 表現型を調べた結果、すべての形質転換体が Tsm⁻ 表現型を示し、rAPase 抑制性表現型が抑圧された。このプラスミドを p293 と命名した。

sef3 変異を相補する領域を限定するため、p293 より挿入断片を切り出し、プラスミドベクター YCp50 または pTI15 に連結して種々のプラスミドを作成した。これらを用いて SH1029 株を形質転換し、rAPase 表現型と温度感受性増殖表現型の相補能を調べた。その結果、*sef3* 変異を相補する DNA 領域は、プラスミド p318 が持つ 1.6 kb *Bam*HI-*Xba*I DNA 断片に限定することができた (図 16)。この領域は *sef3* 変異をホモとした株が示す孢子形成不能表現型も抑圧できることがわかった。同様の表現型を示す *sef6* 変異表現型は p293 を用いても相補できなかった。

SEF3 遺伝子座がどの染色体に存在するかを知るために、パルスフィールド電気泳動ゲル上の SH964 株の染色体 DNA に対してサザン解析を行った。³²P で標識した *Bam*HI-*Xba*I 断片を用いたプローブ DNA の結合実験から、*SEF3* 遺伝子座は第 XIV 番染色体上にあると結論した (図 17)。

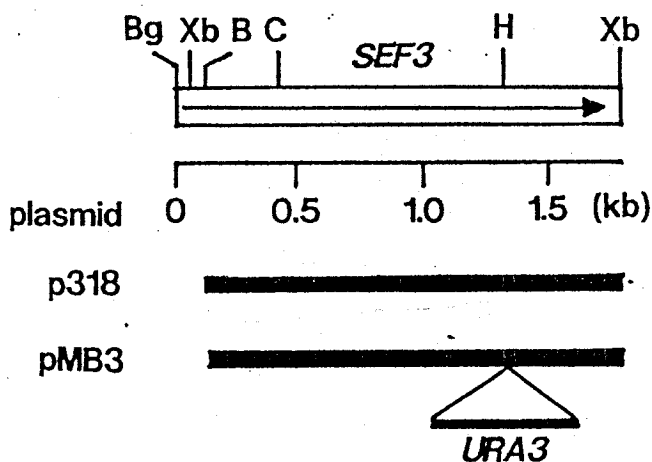


Fig. 16. Restriction maps of the *SEF3* DNA and plasmids. The open box at the top indicates the region in which the nucleotide sequence was determined. Arrow indicates the approximate position and direction of the ORF of *SEF3*. p318 was constructed by inserting a 1.6-kb *Bam*HI-*Xba*I fragment from p293 (described in the text) into the *Bam*HI-*Xba*I gap of pTI15. pMB3 was described in the text. Abbreviations of restriction sites are the same as for Fig. 1, except for H, *Hind*III and Xb, *Xba*I.

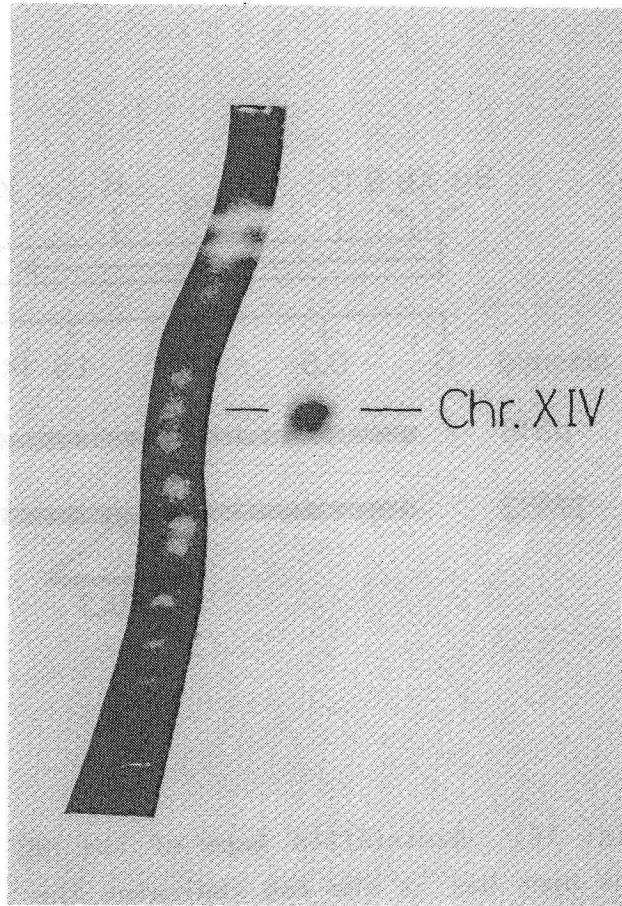


Fig. 17. Mapping of the SEF3 gene by OFAGE and Southern hybridization. Chromosomal samples were from SH964 cells. The gel was blotted onto a nylon filter, and hybridized with the ^{32}P labeled 1.6 kb BamHI-XbaI fragment of p293 containing a part of SEF3 ORF DNA as a probe.

BglII
AGATCTAACGGATTGAACC

XbaI 50

ATGTCCAAAGTAATGAACCCAGCAACGGAAAAGTTCTAGAAAGAGTTCAAAGCAGCCACCTGTAATAAAAATTTCTTCATGCA
 1 N S K V N K P S N G K G S R K [S] [S] K A A T P D T E N F F H A

BamHI 150

AAGAAAAAGGATCCGGTGAACCAAGATAAAGCAAAATAAGTCTTCTCAAATTACGCCAACAGTGGCCACATCTCTCCATCCATCAGATATGGTT
 31 K K K D P V N Q D K A N N A S Q I T P T V P H S H P S D M V

200 250

ATCCCTGACCATTTAGCCGAATTGATTCCTGAGCTGTATTCTTCCACAACTGGTGGATTCCGAGAAAAGATTAGATCATTATTTCAT
 61 I P D R L A R L I P E L Y S P Q Q L V D S E K R L D H F I R

300 350

CTGCCAAATTCATATGAACGGAATGGTTGGCAGTGGGAGAGGTCAAAGCTATCCCAAGAGTTCTTCTATATCTCATTTAAATTTTCCA
 91 L R N L H N K R N V A Q M E R S K L S Q E F L Y P H L N F P

400 450

AATGTAAAATTTCTCCGAATCTCTATTTCAAATGTTAGTGAACCAACCCCTGGCAATGGACACACAAGAATGAGGCTGACCTTATGGCA
 121 N V K F L R I F I S N V S E N Q P V Q N D T N N E A D L N A

500 550

CTGCGAATGCCACTGAGCAGTGAAGATCGAAGGTGATTATTGGACAATGTGCAAGCTAATGATCCAGCAACAGAAAAATTTAGCTCA
 151 L E N A T W T N R I E G R L L D N V Q A N D P A R E K F S S

600 650

TTCTATAGATCCATGCTGAGTACCTTCAAAAATAAGGAAAACGATAATGTGCCATCGCAATAATTTAATGGGGCCCTCAAGAAAATGCC
 181 P I E S I V V D P K N K E N D N V P S T K P N A A P E N A

700 750

ACCGAAGGACCCAGTGAATAAGAAATGAACTTAAACTTACCGTTACAATTTTCACTGCCGAATGGTGACAACTCTACTACGACTAATACC
 211 T E G P S D K K L N L L P L Q F S L P N G D N S T T T N T

800 850

GACCAAAATATGCCACATGGGGGAGGAGCTGCCAAAAGGATATGAGTCTCAAACTCCAAAACATGAGTCACTGAAATGGCAGAT
 241 D Q N H A T N G R E B T A K K D M S S T T P K L E S V K M Q Y

900 950

GACCCGAATATCTGTAGACTTCGATGGTCTCGATATTAAGAGGGTAGGGCTGTGAAAATGTAGAATGCACATTAAGCATCTCGCAAAA
 271 D P N N P V D F D G L D I K R V G [S] E N V E C T I S I L R E

1000 1050

TCATCCCGAGAAAGCCATTATGAGCTACTCTCCACAACCTAACCCCAATAATAGGATTGAAGACCGGTACATCAGATGCAATATT
 301 S S P R E P P N S Y S P Q L T A I I G L E S G T S H D A I P

1100 1150

TCCATATATAATACATCCATTAAATGAATTGCTTACCAATGATGAGTCTGCATTCGAAAAATTTGATGGGCAACAGGAACAATCACAAT
 331 S I Y K Y I H L N E L L T W D E S A F E N L N G N R N N H N

1200 1250

AGCAACACCACTACTAGTAAGATGCTTATGCAGCCTCCAGTCAAGTTTCTATTGTAAAAATAGCACTCAGCTTATTACCTATTACCC
 361 S N T S T A S K N L D A A S S Q V S I V E L D T K I T L L P

1300 1350

AGCAGTCTTAAGAAATCTTCCAGATACAATGAATTAACGGATTACTGTCCTTTATTAATAGTACTCACTGCTGCCATTACAGCCA
 391 I E I D Y T T V R V D K A S T Y G E L V L D I E V P D V N A

1400 1450

AAATTCGAATAATACACAAAGAGAAAGTCAAAATGGGGCTCTGAATTCGAATGAAAATGCCAGGAATTGGAACAATCAACCCCAAGATA
 421 I E I D Y T T V R V D K A S T Y G E L V L D I E V P D V N A

1500 1550

GCTTTACAGGCAAGAAATTAACCTCCCTCTCGAATCTACACGAGAGCAACAAACGATACCGTTCTTCAAGAAATTAAGTACGAGAC
 451 A L Q D K E [S] T S V L S N [S] H E S N K R Y R F F K I S E D

1600 1650

CCAGTTAAGCATTAAATGAATGCATTGCTTCTACCTCGAATGCTTTGAAAAGTTTATCGGGAGATGAGGGCTAATGAAGATATGTA
 481 A L Q D K E [S] T S V L S N [S] H E S N K R Y R F F K I S E D

1700 1750

AGCGGGCTAACTTTTCAAGGAAAATGAAGCTATGTTGGCGAGAAATAGAACTCATATTCAAAATGGAGCAATGAGGCTCTCTTA
 511 P V K A L N E C I A S T S N A L I V L S G D E G Y N E D N V

1800 1850

AGCGGGCTAACTTTTCAAGGAAAATGAAGCTATGTTGGCGAGAAATAGAACTCATATTCAAAATGGAGCAATGAGGCTCTCTTA
 541 R R A N F Y K E N E A N L R E N I E V I L S N G R N

1900 1950

CATTGATACACAAATAGACTGAAGATTATGAGTTTCTTTCTATATAAATCTAGA
 571 R R A N F Y K E N E A N L R E N I E V I L S N G R N

2000 2050

XbaI

Fig. 18. Nucleotide sequence and the deduced ORF of the SEF3 gene. The indicated amino acid sequence is that of the longest ORF found in the sequenced region. Three boxed serine residues are potential phosphorylation sites of cyclic AMP dependent protein kinase and the five encircled leucine or isoleucine residues are homologous to leucine zipper.

第4項 *SEF3* 遺伝子の塩基配列と転写産物

sef3 変異表現型を相補する 1.6 kb の *XbaI*-*BamHI* 領域を含む 1.7 kb *BglIII*-*BamHI* DNA 断片の塩基配列を決定したところ、1698 bp からなる ORF を見いだした (図18)。ORF の下流には酵母の転写終結に必要な配列として提唱されている TAG...TAGT...TTT の配列 (Zaret and Sherman 1982) が存在した。配列上の特徴としては、16 番目と 17 番目のセリンがサイクリック AMP 依存性タンパク質リン酸化酵素によりリン酸化される RKS または RKXS 中のセリン残基と考えられ、466 番目のロイシンからアミノ酸残基 7 個ごとにロイシンまたはイソロイシンが 5 回繰り返されるロイシンジッパー構造がみられた。NBRF (National Biomedical Research Foundation) および EMBL (European Molecular Biology Laboratory) のデータベースを利用してアミノ酸配列、塩基配列の相同性検索を行ったが、既報のタンパク質あるいは遺伝子で有意な相同性を示すものは見つからなかった。

SEF3 遺伝子の転写産物を同定するために、低リン酸培地および高リン酸培地で 30°C, 12-16 時間培養を行った P-28-24C 株より調製した全 RNA に対して、プラスミド pMB3 を ³²P で標識したプローブを用いてノザン解析を行った (図19)。その結果、培地のリン酸濃度にかかわらず、2.2 kb の位置にバンドが検出され、*SEF3* 遺伝子の発現はリン酸による制御は受けないと結論した。

第5項 *sef4* 変異は *PHO81* 遺伝子座に起こった変異である

これまでに、*pho84* 変異による rAPase 構成性表現型が、ホスファターゼ生産調節遺伝子 *PHO4* 遺伝子または *PHO81* 遺伝子の変異により非生産性となることが知られている (Ueda *et al.* 1975)。そこで、*sef* 変異が既知のホスファターゼ生産調節遺伝子の変異アレルであるかを調べるため、SH1547 (*pho84 pho81*) 株と *sef* 変異株である NS164 株 (*pho84 sef3*), NS118 株 (*pho84 sef4*), NS123 株 (*pho84 sef6*) との二倍体雑種を作成し、その株の rAPase 生産表現型を調べた。その結果、SH1547 株 (*pho84 pho81*) と NS118 株 (*pho84 sef4*) との二倍体のみ rAPase 生産が抑制性となり、その他は構成性を示した。このことは、SH1547 x NS118 の二倍体雑種では、*pho84* 変異の rAPase 構成性表現型が抑圧されたことを示している。*pho81* および *sef4* 変異は共に劣性変異であることから、*sef4* と

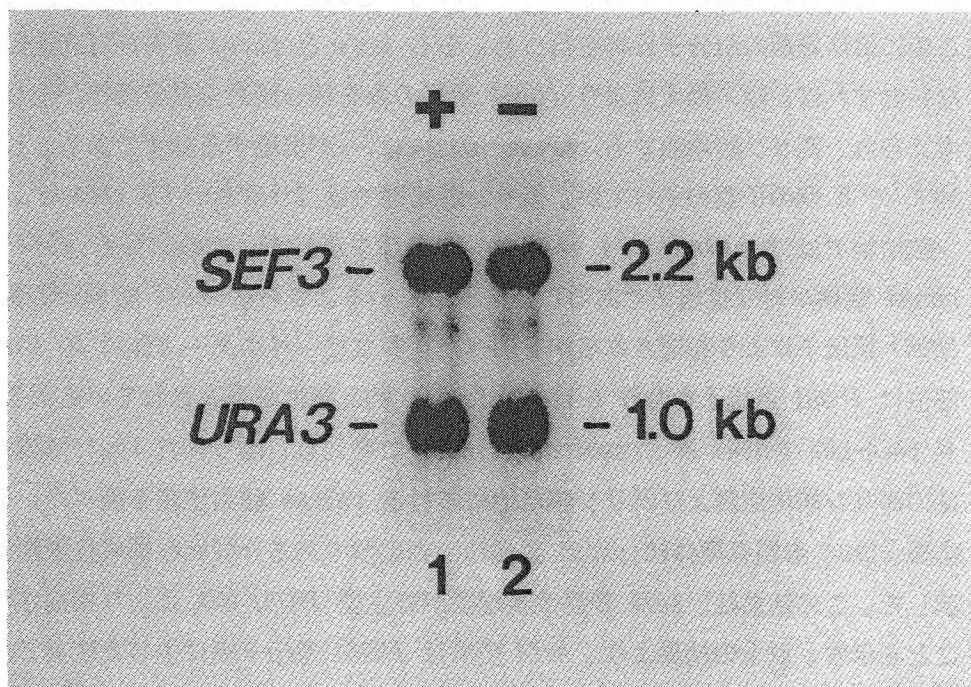


Fig. 19. Detection of SEF3 transcript by Northern hybridization. Total RNAs were prepared from cells of the wild-type strain P-28-24C grown in nutrient high-P_i (+) or low-P_i (-) medium. After electrophoresis, the gel was blotted onto a nylon membrane and the filter was hybridized with a ³²P-labeled 1.6 kb BamHI-XbaI DNA fragment of the SEF3 gene. Samples (10 μg each) of total RNA were used. The specific activities of probes were 1.0 x 10⁸ cpm per μg of DNA. 25S and 18S rDNAs, visualized by staining with ethidium bromide were used as size markers (not shown) as described by Philippsen et al. (1978).

pho81 変異は対立遺伝子であると考えられる。このことをさらに確かめるため、この二倍体雑種の四分子分析を行った。もし *sef4* と *pho81* 変異が対立遺伝子でないとすれば、組み換えにより *pho84* 変異のみを持つ減数分裂分離株が生じると考えられ、高リン酸培地でも *rAPase*⁺ のコロニーが出現するはずである。しかし 30℃ で 8 個の子囊のすべてが、低リン酸培地では 2 *rAPase*⁺ : 2 *rAPase*⁻、高リン酸培地では 0 *rAPase*⁺ : 4 *rAPase*⁻ の分離を示した。この結果も *sef4* と *pho81* 変異が対立遺伝子であることを示している。さらに *sef4* 変異が野生型 *PHO81* 遺伝子により相補されるかを調べた。多コピーベクター YEpl3 の *Bam*HI 部位に *PHO81* 遺伝子を含む 6 kb の *Sau*3AI DNA 断片が挿入されているプラスミド pAC4-LB2 を MB83 株 (*pho84 sef4 leu2*) に導入し、得られた *Leu*⁺ 形質転換体の高リン酸培地および低リン酸培地における *rAPase* 酵素生産を調べた。その結果、*Leu*⁺ 形質転換体は *pho84* 変異株の表現型である *rAPase* 構成性表現型を示した。この結果は、*sef4* 変異の表現型が野生型 *PHO81* DNA により相補されたことを示す。以上の結果より、*sef4* 変異は *PHO81* 遺伝子座に生じた変異であると結論した。また、SH1547 株 (*pho81 pho84*) と NS118 株 (*sef4 pho84*) の雑種二倍体の *rAPase* 生産表現型が抑制性を示したことより、*sef4* 変異は *pho81* 変異に対して優性である事がわかった。

さらに興味深い現象として、*sef4* 変異における *rAPase* 生産が温度感受性を示すことを見いだした。前述の SH1547 x NS118 二倍体よりの減数分裂分離株について高リン酸培地および低リン酸培地上の 37℃ での *rAPase* 活性を調べたところ、いずれの減数分裂分離株も *rAPase* 活性を示さなかった。すなわち、*sef4* 変異株は低リン酸培地上で 25℃ では *rAPase* 活性を示すが、37℃ では活性を失うことが明らかとなった。さらに、MB72 (*sef4*) 株を 25℃ または 37℃ で培養した細胞から回収した全 RNA に対して、*PHO84* ORF の一部を含む 0.7 kb *Cla*I-*Hpa*I DNA 断片を ³²P で標識したプローブを用いてノザン解析を行った結果、25℃ では野生株と同じく低リン酸条件で *PHO84* 転写物の脱抑制がみられたが、37℃ ではリン酸濃度にかかわらず *PHO84* の転写産物が見られなかった (図20)。従って、*sef4* 変異株における 25℃ での *PHO5* 遺伝子や *PHO84* 遺伝子の発現は、*PHO81*⁺ 株と同じであることがわかった。従って、*sef4* 変異は *pho81* 変異の *rAPase* 産生に関して温度感受性変異であると考えられる。しかし、25℃ におけ

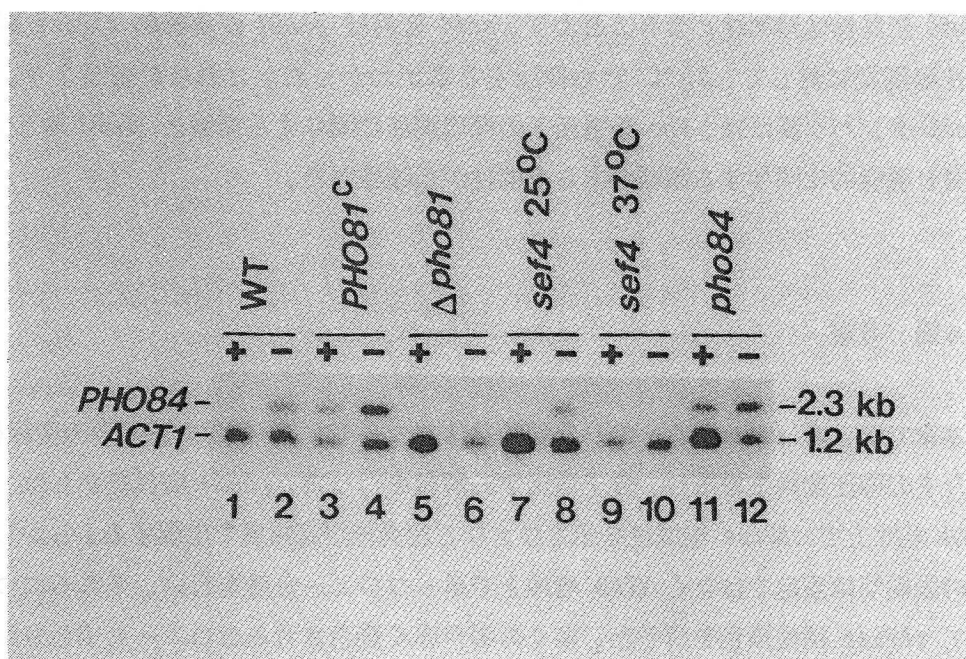


Fig. 20. Detection of the PHO84 transcript by Northern hybridization. Total RNAs were prepared from cells of strains P-28-24C (wild type [WT]), EMB1 (PHO81^c), NBD81-6D (Δ pho81), MB72 (sef4), and NS219 (pho84-1) grown on nutrient high-Pi (+) or low-Pi (-) medium. Samples (10 μg) of total RNA were used. After electrophoresis, the lanes were hybridized with a ³²P-labeled 0.7 kb ClaI-HpaI fragment of the PHO84 DNA and a 1.0 kb XhoI-HindIII fragment of S. cerevisiae encoding the ACT1 gene as probes. The specific activities of both probes were 1.0 x 10⁸ cpm/μg of DNA. 25S and 18S rDNAs visualized by staining with ethidium bromide were used as size markers as described by Philippsen et al. (1978).

る *PHO81⁺ pho84* 変異株の rAPase 産生表現型は構成性であるのに対して、*sef4 pho84* 変異株は抑制性となることより、*sef4* 変異は *pho84* 変異株の rAPase 構成性表現型に対して、25°C でも抑圧する事がわかった。これらの結果より、Pho81 タンパク質には、*Pho* 系遺伝子の発現調節に関与する領域と Pho84 タンパク質と機能的に関与する領域のある可能性が示唆された。

第4節 考察

本章では、*S. cerevisiae* のリン酸輸送体をコードする *PHO84* 遺伝子の変異株よりその抑圧変異を取得し、分子遺伝学的解析を行った。*pho84* 変異株からは、YPAD 培地上で rAPase 構成性を示さなくなる変異株が高頻度で出現する。しかし、その表現型は安定ではなく YPAD 培地上で単一コロニー分離を行い、それらについて rAPase 活性染色を行うと、多くの場合赤く染色されるコロニーと染色されないコロニーの両方が出現する。本章では単離した 7 株のうち、抑圧能が安定で増殖も悪くない3変異株について解析を行った。*pho84* 変異株が rAPase の構成的生産表現型を示す理由として、細胞内にリン酸が取り込まれないことより、培地中のリン酸濃度にかかわらず細胞内が低リン酸条件となるためではないかと考えている。従って、*pho84* 変異より抑圧変異を分離すれば i) リン酸をわずかながらも取り込むことができるようになり、そのために rAPase の生産が抑えられるようになる変異、ii) リン酸取り込み能は相変わらず低いにもかかわらず、細胞内ではリン酸が十分あるような信号が伝えられ、その結果高リン酸培地上では rAPase 活性を示さなくなる変異を考えることができる。i) の変異はリン酸の取り込み系に関与している遺伝子の変異であると考えられる。しかし、ii) の変異の場合は低リン酸条件でも rAPase 活性を示さなくなってしまうと思われるが、すべての *sef* 変異株は低リン酸条件では rAPase を生産した。従って、この可能性は考えにくい。*sef* 変異株についてヒ酸に対する感受性を調べたところ、耐性の株と感受性の株があった。感受性になった株については、細胞表層構造が変化し、再びリン酸とヒ酸を取り込むようになり、rAPase 生産調節が回復するi) の変異の可能性が考えられる。ヒ酸耐性表現型を失っていない *sef* 変異では、ヒ酸よりもリ

ン酸に対する親和性が高い取り込み系が働きだしたと考えるか、またはリン酸濃度検知系の異常で高リン酸培地上で rAPase を生産しなくなった可能性が考えられる。しかし、本章で得られている *sef* 変異株はすべて低リン酸培地で rAPase を生産するので、細胞内リン酸濃度検知系に異常が起こったとしても、本章で用いた低リン酸培地では脱抑制すると考えなければならない。

sef3, *sef6* の両変異株は、*pho84* 変異の rAPase 構成性表現型を抑圧するだけでなく、37°C で増殖できなくなる温度感受性増殖表現型を引き起こし、さらに *sef3/sef3* あるいは *sef6/sef6* のホモ二倍体は孢子形成不能となった。この結果は、これらの遺伝子が細胞分裂や減数分裂において何らかの重要な働きをする可能性を示唆している。*sef3* 変異株を 37°C で増殖させると、つぶれた細胞が数多く見られることから、これらの遺伝子産物が細胞形態の維持にも関与している可能性が考えられ、そのために高温で増殖できなくなるのかも知れない。塩基配列から推定される Sef3 タンパク質アミノ酸配列に膜タンパクに特有な疎水性領域は見いだされなかった。今後、Sef3 タンパク質の機能をさらに明らかにするためには、細胞内における局在性を知る必要があるだろう。

第5節 要約

リン酸取り込み系に関与する遺伝子を取得するため、*pho84* 変異株の YPAD 培地上での rAPase 生産性表現型を非生産性とする突然変異株 (*sef*) を自然突然変異により分離し、解析を行った。これらの変異はすべて単一の核性劣性変異で、*pho84 sef* 遺伝子型を持つ株は、低リン酸培地上では rAPase を生産することにより、*pho84* 変異の rAPase 構成性抑圧変異といえる。これらの変異は、7 つの相補群に分けられた。*sef3* および *sef6* 変異株は 37°C では増殖しない温度感受性増殖表現型を示し、さらに、*sef3/sef3* あるいは *sef6/sef6* のホモ二倍体は孢子形成不能であった。*sef4* 変異は、rAPase 生産調節に必要な仲介因子をコードする *PHO81* 遺伝子座の変異で、37°C では脱抑制条件下でも rAPase 活性を示さない温度感受性変異であった。

第4章 リン酸取り込みに関与する *GTR1* 遺伝子の解析

第1節 緒言

真核生物では、GTP 結合タンパク質をコードする遺伝子が多く単離されている。それらは癌遺伝子として知られる *ras* を代表として *ras* スーパーファミリーと呼ばれる (総説、Barbacid 1987; Gibbs and Marshall 1989)。*ras* タンパク質および *ras* 関連タンパク質は、互いに構造的また機能的に似通った性質を持つと考えられ、GDP 結合型から GTP 結合型への構造的変化が他のタンパク質との相互作用を変化させ、それにより細胞内での活性調節を行っていると考えられている (Milburn *et al.* 1990)。

これまでの解析により、*S. cerevisiae* の高親和性リン酸取り込み系は、*rAPase* と同じシステム (Yoshida *et al.* 1989b) により、培地中のリン酸濃度が低いときに転写レベルで脱抑制することを明らかにした。さらに、*pho84* 変異株では、i) *rAPase* 生産構成性 (Ueda *et al.* 1975)、ii) リン酸取り込み活性の低下 (Tamai *et al.* 1985; Ueda and Oshima 1975)、iii) ヒ酸耐性 (第2章) の多面表現型を示すことを明らかにした。

PHO84 遺伝子の塩基配列の解析途上、*PHO84* ORF に近接した別の ORF を見いだした。その塩基配列より予想されるアミノ酸配列には、GTP の結合に必要な配列が存在し、*GTR1* 遺伝子と命名した。*GTR1* 遺伝子破壊株を作成し解析を行った結果、*pho84* 変異株と同じ多面表現型を示した。しかし、*gtr1* 遺伝子破壊株では *PHO84* 遺伝子の転写は弱い構成性を示した。以上の結果、*Gtr1* タンパク質は *Pho84* リン酸輸送体と機能的に関連のあるタンパク質であると考えられた。

第2節 実験材料および実験方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第1章において記述した以外の内容について記述した。

供試菌株とプラスミド

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表5 に示す。*PHO84* 遺伝子の発現を調べるために、*PHO84-lacZ* 融合遺伝子をもつプラスミド pMB142 (図1) を用いた。*GTR1* 遺伝子の破壊に用いた *HIS3* 遺伝子の 1.7 kb *Bam*HI DNA 断片および *URA3* 遺伝子の 1.2 kb *Hind*III DNA断片は、それぞれプラスミド YIp1 および YEp24 (Parent *et al.* 1991) より調製した。*GTR1*, *PHO84*, *URA3* 遺伝子の転写産物を検出するためのプローブに用いた pMB201 は、YIp5 の *Cla*I-*Nru*I 間隙に *PHO84* 遺伝子の ORF の一部を含む 0.7 kb *Cla*I-*Hpa*I DNA 断片を挿入した後、さらにその 0.7 kb 挿入断片内の *Hind*III 部位に *GTR1* 遺伝子の ORF の一部を含む 0.7 kb *Hind*III₂-*Hind*III₃ DNA 断片 (図21) を結合して作製した。*GTR1-lacZ* 融合遺伝子をのせた YEp 型プラスミド, pMB205 は、プラスミド pMB15 (図1) より調製した *PHO84* および *GTR1* 遺伝子 ORF の一部を含む *Hind*III₁-*Hinc*II₂ DNA 断片の *Hinc*II 部位に、12 塩基の *Bam*HI リンカーを結合し *Hind*III 部位はKlenow fragment を用いて平滑化した DNA 断片を、pMC1587 プラスミドの *Sma*I-*Bam*HI 間隙に挿入して作製した。その他の新しく作製したプラスミドは図21 に示した。

Table 5. *S. cerevisiae* strains used

Strain	Genotype ^a
KA31	<i>MATa/MATα ade2/ade2 his3-532/his3-532 leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3</i>
MB200	<i>MATa ade2 his3-532 leu2 trp1 ura3 gtr1-1Δ</i>
MB203	<i>MATa ade2 his3-532 leu2 trp1 ura3 pho84-1Δ</i>
PP2	<i>MATα ade2 his3-532 leu2 trp1 ura3</i>
PP4	<i>MATα ade2 his3-532 leu2 trp1 ura3 gtr1-2Δ pho84-2Δ</i>
PP9	<i>MATα ade2 his3-532 leu2 trp1 ura3 gtr1-3Δ</i>

^a The genetic symbols used are as described (Mortimer *et al.* 1989).

使用培地と培養方法

グルコースの取り込み活性の測定には YP 培地 [1 liter 当たり Yeast extract 10 g, ポリペプトン 20 g] を用いた (Lewis and Bisson 1991)。硫酸イオンの取り込み活性を測定するために使用した硫酸塩欠乏培地は、高リン酸合成培地に含まれる 2 g/l の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を同濃度の MgCl_2 に置き換えたものを用いた。

生化学的方法

グルコース取り込み活性の測定 Lewis と Bisson の方法 (1991) に従った。酵母菌体を YPAD 培地で定常期まで培養を行い、集菌・洗浄して等量の無菌水に懸濁し、0.05% のグルコースを含む YP 培地に 1% 量の菌体懸濁液を植菌し、30°C 14 時間振とう培養を行った。その菌体よりグルコースを除くために室温で 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) を用いて洗浄を行った後、同じ緩衝液で OD_{580} がおよそ 15 になるように再懸濁した。細胞懸濁液に適当量の放射性グルコース ($\text{D-[U-}^{14}\text{C] glucose}$; Amersham) を加え 30°C で培養を行った。経時的に菌体懸濁液の採取を行い、その液よりニトロセルロースフィルターを用いてろ過を行い菌体を回収し、脱イオン水で洗浄後、乾燥させてからその放射活性を液体シンチレーションカウンター (モデル LS6000IC; Beckman) で測定した。得られた測定値を、その酵母菌体におけるグルコース取り込み量とした。

硫酸塩取り込み活性の測定 MaCready と Din の方法 (1974) に従った。高リン酸合成完全培地で定常期まで培養を行った菌体を、硫酸塩欠乏培地で 2 回洗浄した後、同じ培地に再懸濁し 30°C で 4 時間培養を行った。その後、 OD_{660} がおよそ 1 となるように同じ培地に懸濁した。細胞懸濁液に適当量の放射性 $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (E. i. du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, Del) を加えて 30°C で培養を行った。その後の操作はグルコース取り込み活性の測定と同じ方法を用いた。

第3節 結果

第1項 *GTR1* 遺伝子の塩基配列の決定

PH084 遺伝子 ORF の塩基配列を決定した際 (図3, 4)、PH084 遺伝子上流に、GTP 結合タンパク質に対して相同性を示すタンパク質コード域を見いだした (図21)。その ORF の塩基配列より推定されるアミノ酸配列中に見られる GTP の結合に必要とされているコンセンサス配列を図22, 23 に示す。この遺伝子を *GTR1* (GTP-binding protein resemblance) と命名した。*GTR1* 遺伝子の ORF の開始コドンは、PH084 遺伝子上流 1129 塩基離れた位置に存在し、その ORF の大きさは 310 アミノ酸残基であった。5'-非翻訳領域には TATA 配列は認められなかったが、ポリ (dA-dT) 配列が -193 から -245 と -328 から -399 の領域に存在した。プロモーター領域にポリ (dA-dT) 配列が存在する遺伝子は、構成的に発現すると考えられている (Struhl 1985)。ポリアデニル化に必要なコンセンサス配列 AATAAA が +1033, +1060, +1189 の 3ヶ所に存在した。

GENETYX プログラムを用いて、Gtr1 タンパク質のアミノ酸配列と EMBL タンパク質データベースのデータを比較した結果、ras ファミリーに属するタンパク質である Ypt1 タンパク質 (Gallwitz *et al.* 1983) および human rho12 タンパク質 (Yeramian *et al.* 1987) との間に比較的高い相同性が見いだされた (図23)。Gtr1 タンパク質の N末領域と Ypt1 タンパク質および rho12 タンパク質とはそれぞれ 24.5%、22.3% の相同性がみられた。また、保存された領域には GTP の結合に必要な3つのコンセンサス配列 (Bourne *et al.* 1991) が存在し、そのコンセンサス配列の間隔にも類似性が認められた。しかし、多くの GTP 結合タンパク質に共通して保存されている 3 目目のコンセンサス配列におけるアスパラギン残基が、Gtr1 タンパク質ではヒスチジン残基であった。GTP 結合タンパク質のほとんどで保存されていて、膜とタンパク質との結合に必要なシステイン残基 (Hancock *et al.* 1989) は Gtr1 タンパク質には存在しなかった。

第2項 *GTR1* 遺伝子の発現

PH084 遺伝子上流には、PHO 系の転写活性化因子である Pho4 タンパク質の結合部位として提唱されている 5'-CACGTG(T)-3' の 6 塩基の配列 (Hayashi and Oshima 1991) が 5ヶ所存在した。そして PH084 遺伝子の発現は Pho4 タンパク質を介して、細胞外のリン酸濃度により制御されていた (図7)。さらに、*GTR1* 遺伝子の翻訳開始コドンのアデニンを +1 としたとき、-26 の位置に Pho4 タン

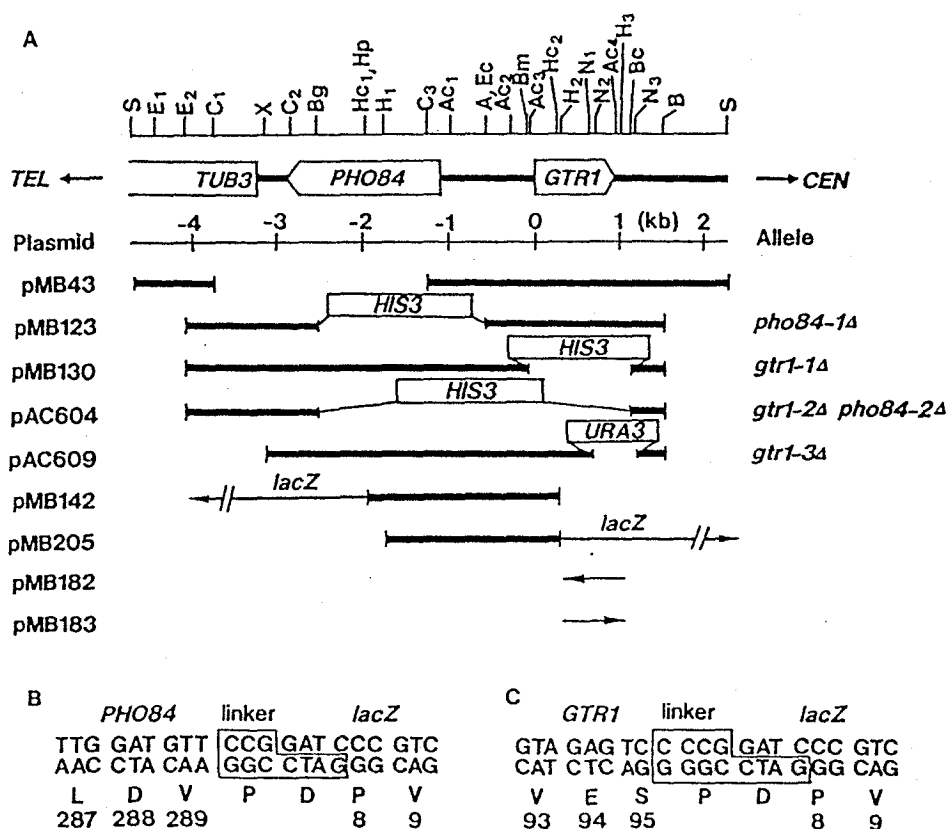


Fig. 21. Restriction maps of the *GTR1* DNA and plasmids, structures of the ligation sites in the *PHO84-lacZ* and *GTR1-lacZ* fusion genes. (A) Restriction maps and structures of the original 7-kb *Sau3AI* fragment cloned on plasmid, p373 a YCp50 based plasmid (Fig. 1), and its derivatives are indicated. Open arrows indicate the ORFs of *TUB3*, *PHO84*, and *GTR1*. Plasmid pMB43 was constructed by deleting a 2.5-kb *ClaI*₁-*ClaI*₃ fragment from p373. Plasmid pMB123 was described previously (Fig. 1). pMB130 was constructed by inserting a 1.7-kb *Bam*HI fragment of the *HIS3* gene prepared from YIp1 into the 1.3-kb *Bsm*I-*Bcl*I gap of pMB15 (Fig. 1; detailed procedures for construction not shown). pAC604 was constructed by inserting the 1.7-kb *Bam*HI fragment of the *HIS3* gene into the *Bgl*II-*Bcl*I gap of pMB15. pAC609 was constructed as follows: A hybrid plasmid was constructed by

cloning a 4.7-kb XhoI-BamHI fragment of the PHO84-GTR1 DNA into the SalI-BamHI gap of pUC118. Then a 1.2-kb HindIII fragment containing the S. cerevisiae URA3 DNA prepared from YEp24 was blunt ended and inserted into the 541-bp Nsp(7524)V1-Nsp(7524)V3 gap of the PHO84-GTR1 moiety of the hybrid plasmid. pMB142, bearing a PHO84-lacZ fused gene, was constructed previously (Fig. 1). Plasmid pMB205, a YEp-type plasmid bearing a GTR1-lacZ fused gene, was constructed as follows. A 2.1-kb HindIII₁-HincII₂ fragment of the PHO84-GTR1 DNA, prepared from pMB15, was connected with a 12-bp BamHI linker (Takara Shuzo Co., Kyoto, Japan) at the HindIII₁ end. Then the fragment was inserted into the SmaI-BamHI gap of pMC1587 (Fig. 1) to form pMB205. The arrows with "lacZ" on the plasmids pMB142 and pMB205 represent the reading direction of the lacZ gene. pMB182 and pMB183 were constructed by cloning the 0.7-kb HindIII₂-HindIII₃ fragment into HindIII site of pUC119 and were used to generate single stranded DNA in the indicated directions. Abbreviations of restriction sites are the same as for Fig. 1, except for Ac, AccI; Bc, BclI; Bm, BsmI; Ec, EcoO109I; H, HindIII and N, Nsp(7524)V. Two or more identical restriction sites in the map are distinguished by suffixes. The only Sau3AI sites indicated are those at the end of the 7-kb fragment. The recognition sites for BclI and ClaI indicated as Bc and C₂ overlaps the methylation site of dam. Panels B and C show the nucleotide sequences of the ligation sites of the PHO84-lacZ and GTR1-lacZ fusion genes, respectively, in plasmids pMB142 and pMB205. The numbers below the amino acid sequence represent the codon numbers relative to the ATG translation initiation codon of the PHO84, GTR1, and lacZ genes, respectively.

-1750
 HindIII
 AAGCTTGGTTAGCAAGACGACCCATGATGGCACT
 -1700
 CTCCATTGGTAGTGGCAAAATCAGAAGTAATAAGAGATAGTGGGTAGTCAACCACCG
 -1650
 ATACCAATACCCATGACAATACCGTAGAATGTTAAACAGCAACGAAGTTAATAGCAGGA
 -1600
 GAATGAGCAACGAAGTTAATAGCAGGAGAAATGAGCAACAGTGGTTTGCAGAATGGTACAG
 -1550
 ACAATCATGATAAATAGTCCATACCATAAATCTCTTACGACCAACAATATCAGCTAAA
 -1500
 GTACCAAAACCAATATGACCAATAACAGTACCAACAGAAAGTGGAAACCTTCAACAAGTT
 -1450
 TGACTTGGACCTGGCATACTACCGTGCCAGTAAACGTAGGACATCATAGTATACCCAAA
 -1400
 TTAATGGCAAAATATCATAAGAAATCTGTCAAGAAACCAACACCAAGTGGAGATGGTC
 -1350
 TTAACCTGTTGCCAACCGAAACCTTGGTATCGATGGACTCCAAAGCCAATCTTCTTCTT
 -1300
 TCCAGAGGATCTTCAATATGAGCAAAATCATCAAAATGGTTGGGAAGGCCATGTTACCA
 -1250
 CCTTCGGTAAGGTGTTCTTTATGAAGACTCTCTTCAGCAACATGAATAGTATCTTTATTG
 -1200
 ACGGAATCATTGGATTGTTATCGTGGAGTTTGGTTGTTGTGTGCCCTGGTGATCTAC
 -1150
 GAGATGAGGAAGATAAAATTTAGAAAGTGAACCTAGAACTTTACTTTATACAAGATGA
 -1100
 GGATGAGCTTATATATATACATATACGATACGAGGCCAATAGTAAGTGGATCAAGTTGCCATT
 -1050
 ACCGGTGTGCAATGTGGTGCATCATGCTGCCAAAAGGAATAAATAGCTCATAGAT
 -1000
 GAGGTGGTTAATTAATGAGTAATACCGACGTTTTTAATCTAGCTAATAAGCAGGCAAAA
 -950
 CGGGAAGAGGGGATAAGGAAAGCCCTTTCACACGACATTTGGTGCAATCACTGCACCGATC
 -900
 TCACTGATTTCGATGAGTACGCGGCGAACCATAATCAATGCGCTCGCTAATTCCGCCCG
 -850
 ACGTGTGGAATAACACGTCACGCTGGAACCTAATAATGGCATCGGGCGGTGCGGACG
 -800
 TGAGAGGAACGGGTGTTTTTCAGCGGGCAACATTTCTTCATAGCCGCTAGATGAGTTG
 -750
 AAAGGGCTTACGAGCAAAATGCTGCAAGTATAGGGGCGCTATAACAGCACCAACGTCGG
 -700
 TAATACTGATTGCTGTCATTCTTGGCATGTTTCTTGGTCAAGGTCTGTGATCTCCCT
 -650
 TCCGGTTGTGCTTTTCAATAAATAGTGTTTTTTATTCAATAATTGGTAATAACGGTT
 -600
 GATAACGAGCGGCTGATAAATAGTTCTTTTTTTTTTTTAAATTTTTTTTTTTTGTATC
 -550
 TCATTCTTTTTTATGAATCTTTTTTTTTTTGTAAGAAATAAAGGTTTATTAGGCAG
 -500
 AGTATACCGAGTGGTTGAAGTCATCCGGTAGTGATTATTCACGTGACACTTTTT
 -450
 TATTCCTTTCTCTTTCTTTTAAATTTTTTTTTTTTTCATTGATTACCGGCT
 -400
 CTCTTTATCACTCTCGCATCTGCTAGTAAACGGTAAAAAAGCAAGTAAAAAGTTCA
 -350
 ATGTGGGACCTACCCATAAATGTGATTATGGTAATAATTTCTTTTGAATAAATACAAT
 -300
 AGGTATCTTACACAGGAGTGAAGGCCATCAAAATACGTTTATCAATCGACAATTTAGTA
 -250
 ATGTCGTAATAATAGGAAGAACTGCTCTGATGGCGGTGCGGCTCGGTAATCG
 -200
 1 M S S N N R K K L L L M G R S G S G K S
 -150
 TCAATGAGGTGATCATCTTTAGTAACACTCCGCTTTTGACACTAGGAGATTGGGTGCC
 -100
 21 S M R S I I F S N Y S A F D T R R L G A
 -50
 150
 ACCATTGATGATAGGACCTCCCATTTGAGATTCTTGGGAATATGACTCTAAATCTGTGG
 41 T I D V E H S H L R F L G N M T L N L W
 200
 GACTGTGGTGGGAGGAGTGTATTCGAGAATATTTACCAAGCAAAAGACCACATT
 61 D C G G Q D V F M E N Y F T K Q K D H I
 250
 TTCCAGATGGTGCAGGTGTTAATTCACGTTTGTGATGAGTCAAGTGAAGTTCTCAAG
 81 F Q M V Q V L I H V F D V E S T E V L K
 300
 GATATTGAAATATTTGCCAAAGCTTGAAGCAATTAAGGAAGTACTTCCCGACGCCAAA
 101 D I E I F A K A L K Q L R K Y S P D A K
 350
 ATTTTGTCTTCTGCATAAAGTGGATCTTGTTCAGTTGATAAGAGAGAGGAGCTTTC
 121 I F V L L H K M D L V Q L D K R E E L F
 400
 CAAATCATGATCAAAAACCTGAGTGAACGCTCTTCGGAATTTGGGTTTCCCAATCTGATA
 141 Q I N M K N L S E T S S E F G F P N L I
 450
 GGTTTCTCTACTTCGATTGGGATGAGATTATACAAGGATGGTCCGAGATTGTATGC
 161 G F P T S I W D E S L Y K A W S Q I V C
 500
 TCGCTAATACCAATATGTCCAACCACTAAAGTAATTTGAAGAAGTTAAGGAGATTATG
 181 S L I P N M S N H Q S N L K K F K E I M
 550
 AACCCCTTGAATTTATCTTTTCGAAAGAACAACTTCTTAGTGATATGCTCCAGTAAT
 201 N A L E I I L F E R T T F L V I C S S N
 600
 GCGCAAAATAGTAATAAATCATGATGTCGGAATAAATAATGTCTGCTAGACCGG
 221 G E N S N E N H D S S D N M N V L L D P
 650
 AAGCGATTGCAAAAGATATCCAATATAAGTAAAAACCTCAAGCAGAGTTGCAGCAAAATG
 241 K R F E K I S N I M K N F K Q S C T K L
 700
 AAGCGCGGATTCAAGACTTTAATATTGAACAACATCTACGTCAGCGAGTTATCGTCC
 261 K S G F K T L I L N N N I Y V S E L S S
 750
 AATATGGTGTGTTTTATAGTGTGAAAGATATGAATATCCACAAGATTAGTATTGGAA
 281 N M V C F I V L K D M N I P Q E L V L E
 800
 AACATCAAAAAGCCAAAGAGTTTTTCCAATGACTGAGGTGATAGAGCAAAACATTCGGC
 301 N I K K A K E F F Q
 850
 AATTGAGTGTTCGGGGGATAAGAATTATAAAGCTTTCGTTACGTATATACAAATGGGA
 1050
 TTGGCGTATAAAATAATAGAGAACATAAGAGGAAGAAATAAATATACAGATATAT
 1100
 ATATAGGACAATGGGAGGAAAAAGCTGAAGTATCAACCAATCTGTGCGGGTTTTTTC
 1150
 TTGTGCTATTAGTCAAGCATCATTTGCAAAAAAGTGGGAATATATAAATAAATCAATCA
 1200
 TGTGCTTTTTTGTGCGGTGTGTGTGTGTGTAGTTTGTGTAGAGGTTTATAGAAAA
 1250
 AAAGGATGCAAACTCAGGAAAAACCGTGCCTACCACTTTTTCCTTTTCCAGAAAAAG
 1300
 GGCATGTAATTTTCATCTATAATCTCTTTAAAAAGTCTTTTGAATAATGCTAATTAA
 1350
 TCCAGTCGAAAAAGACCTTTAATCTCGATCTTGAGATAGATATCGGCAAGTACAAAA
 1400
 TTCTCCATAAGTAGAAGGTCATTAAGCACCACCGGTGTAATAATGTTCTTTACCGGAAGC
 1450
 1500
 TATGTTGCAATGGCC

Fig. 22. Nucleotide sequence and the deduced ORF of the GTR1 gene. The indicated amino acid sequence is the longest ORF found in the sequenced region. The ATG initiation codon of the PHO84 ORF is boxed (indicated as CAT as the PHO84 coding frame is in the opposite direction of that of GTR1). Sequences homologous to the potential polyadenylation sequence, AATAAA and the 6-bp Pho4 binding motifs are double underlined.

A

Gtr1	1	MSSNNRKLLLMGRSGSGKSSMRSIIIFSNYSAFDTRRLGATIDVEHS-HLRFLGNMT
Ypt1	1	MNSEYDYLKLLLIICNSGVGKSCL-LLRFSDDTYTNDYISTIGVDFKIKTVELDGKTVK
rho12	1	MAAIRKKLVIVGDGACGKTCL-LIMFSK-DGPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVE

Gtr1	57	LNLWDCGGQDVFEMENYFTKQKDHIFQMVCVLIHVFEDWESTEVLKDIEIFAKLQQLRKYS
Ypt1	59	LQIWDTAGQE-----RERTITSSYYRGSHGIIIMYDVTDCESFNGVKMW---LQEIDRYA
rho12	55	LALWDTAGQE-----DY-DRLRPLSYPTDVLIMCESIDSPDSLENIP--EKWTPEVKHFC

Gtr1	117	PAKII-FVLLHKMDLVQDKREELFQIMGNLSETSSSEFGFFNLIG...
Ypt1	111	TSTVLKLLVGNNKCDL--KDKRVVEYDV-AKEFADANKMPFLETSAL...
rho12	108	ENVPT-ILVGNKKDLRNDENTRRELAKPKQEPVKPEEGRDMANRIG...

B

	I	space	II	space	III
Consensus	XO00OGXXGXGKS		OJOODXAGJX		O00ONKKXD
					TQ
GTR1	8 KLLLMGRSGSGKS	36	LNLWDCGGQD	55	FVLLHKMD
YPT1	10 KLLLIGNSGVGKS	36	LQIWDTAGQE	47	LLVGNKCD
rho12	7 KLVIVGDGACGKT	35	LALWDTAGQE	48	ILVGNKCD

Fig. 23. Homology of Gtr1 protein with GTP-binding proteins. (A) Amino acid sequence similarity of the predicted Gtr1 protein with other GTP-binding proteins. The amino acid sequences of the Ypt1 and rho12 proteins are aligned to obtain maximum fitting with the Gtr1 sequence. Identical residues of the Gtr1 protein with Ypt1 (Gallwitz et al. 1983) and rho12 (Yeramian et al. 1987) proteins are boxed. The numbers at the left indicate positions of the first amino acid residues in the respective lines. Dashes indicate gaps introduced to optimize the alignment. (B) Comparison of GTP binding motifs in Gtr1, Ypt1, and rho12 proteins. The consensus sequence is that proposed by Bourne et al. (1991). X indicates any amino acid, whereas O and J represent hydrophobic and hydrophilic residues, respectively.

バク質の結合部位を見いだした。これらの事実より、*GTR1* 遺伝子の転写が培地中のリン酸濃度により制御されることが予想された。高リン酸培地または低リン酸培地で培養を行った野生型株 P-28-24C 細胞より回収した全 RNA に対して、*GTR1* のアンチセンス鎖をコードする pMB182 由来の一本鎖 DNA を ^{32}P でラベルしたものをプローブに用いてノザン解析を行った結果、およそ 1.4 kb の位置にプローブとの結合シグナルが検出された。しかし、pMB183 由来のセンス鎖をプローブに用いて同じ実験を行ったときには、結合シグナルは認められなかった。1.4 kb の転写産物は、塩基配列より推定される *GTR1* 遺伝子の大きさと転写方向に矛盾しない。1.4 kb 転写産物の量は、低リン酸条件下においても非常に低く、培地中のリン酸濃度による制御は受けてないと考えられる。

GTR1 遺伝子の発現をさらに調べるため、*GTR1-lacZ* 融合遺伝子を YEp 型プラスミドにのせた pMB205 を用いて解析を行った。このプラスミドは、*GTR1* 遺伝子上流 1778 bp、そして *GTR1* 遺伝子の N 末端より 284 bp を持つ 2062 bp *HindIII*₁-*HincII*₂ 断片を *lacZ* ORF とコドンフレームが合うように結合して構築した。pMB205 を導入した PP2 (*GTR1*⁺) 株を高リン酸培地または低リン酸培地で培養を行い、対数増殖期後期 ($\text{OD}_{660} = \text{ca. } 1.0$) における β -ガラクトシダーゼ活性を調べたところ、低リン酸培地での活性値は 21.9 ± 5.6 (mg タンパク質あたりの単位数)、高リン酸培地では 23.6 ± 4.2 であった。同じ *GTR1-lacZ* 融合遺伝子を含む YCp 型プラスミドを用いて同じ実験を行ったところ、リン酸濃度に関わらず β -ガラクトシダーゼ活性は検出できなかった。これらの結果より、*GTR1* 遺伝子の発現は非常に低く、しかも転写量は外界のリン酸濃度によって変化しないと考えられる。

第3項 *gtr1* 遺伝子破壊株は rAPase 構成性表現型を示す。

細胞内での Gtr1 タンパク質の機能を調べるため、KA31株 (*his3/his3 ura3/ura3 GTR1*⁺/*GTR1*⁺ *PHO84*⁺/*PHO84*⁺) を用いて Rothstein の方法 (1983) により *gtr1*あるいは *pho84* 遺伝子破壊株を作成した。*HIS3* 遺伝子を含むプラスミド pMB123, pMB130, pAC604 (図21) の *Bam*HI-*Eco*RI DNA 断片、そして *URA3* 遺伝子を含むプラスミド pAC609 (図21) の *Bam*HI-*Eco*RI (この *Eco*RI 部位はベクター上に存在する) DNA 断片を用いて遺伝子破壊を行った。無作為に選んだ

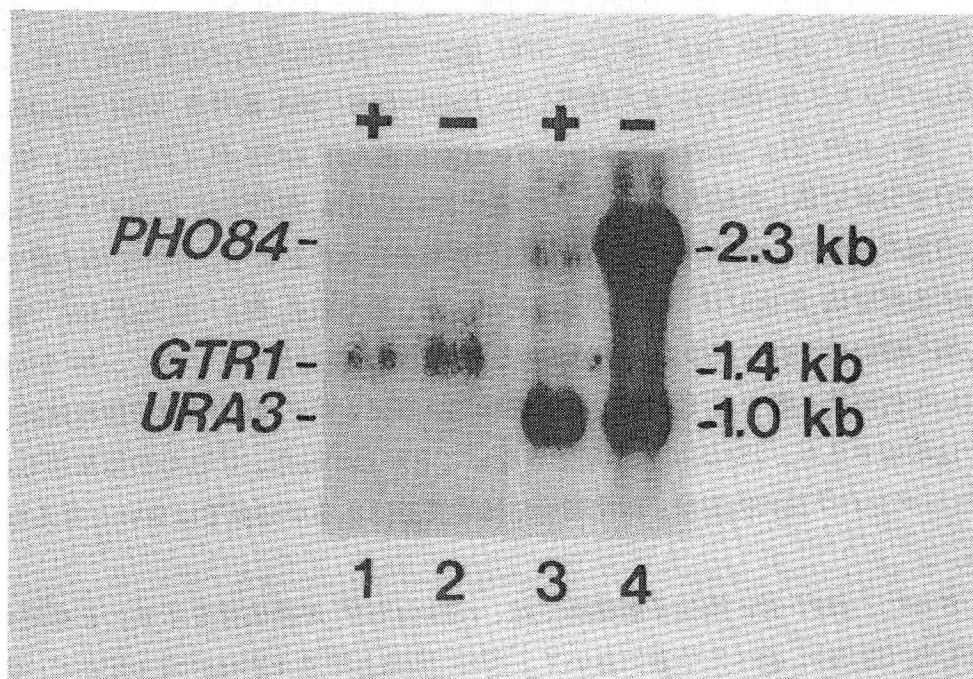


Fig. 24. Detection of the GTR1 transcript by Northern hybridization. Total RNAs were prepared from cells of the wild type strain P-28-24C grown on nutrient high-Pi (+) or low-Pi (-) medium (as shown above lanes). After electrophoresis, the gel was blotted onto a nylon membrane and the filter was hybridized with a ^{32}P -labeled 0.7-kb HindIII₂-HindIII₃ antisense ssDNA of GTR1 (pMB182, lanes 1 and 2) or pMB201 bearing the GTR1, PHO84, and URA3 DNAs (lanes 3 and 4). Samples (10 μg each) of total RNA were used. The specific activities of probes were 1.0×10^8 cpm per μg of DNA. 25S and 18S rRNAs, visualized by staining with ethidium bromide (not shown), were used as size markers as described by Philippsen et al. (1978).

His⁺ あるいは Ura⁺ 形質転換体を孢子形成させ四分子分析を行った。サザン解析を行い His⁺ および Ura⁺ 株では *GTR1* 遺伝子が破壊されたことを確認した (図 25)。プラスミド pMB130 より調製した *Bam*HI-*Eco*RI DNA 断片を KA31 株に導入して得られた His⁺ 形質転換体のうち、任意に選んだ KA31-d1 (*gtr1-1Δ*) 株を四分子分析に供した結果、すべての子囊において His 表現型は 2 His⁺:2 His⁻ の分離を示した。pAC609 を用いて同様の実験を行ったところ、すべての子囊で Ura 表現型は 2 Ura⁺:2 ura⁻ の分離を示した。得られた His⁺ または Ura⁺ 減数分裂分離株はコロニーの大きさが His⁻ 株や Ura⁻ 株に比べて小さく、約 2 倍の長い世代時間を要する (図 26)。また興味深い事に、His⁺ 減数分裂分離株は 30°C では増殖するが、15°C では増殖できないことがわかった。これらの結果より、Gtr1 タンパク質の機能は、細胞増殖には重要ではあるが必須ではないと考えられる。

さらに、*gtr1-1Δ* 遺伝子破壊株では、rAPase 生産 が構成性を示すことを見いだした (図 26)。調べた子囊において、YPAD 培地上で 2 rAPase⁺:2 rAPase⁻ の分離比を示し、rAPase⁺ 表現型を示した株はすべて His⁺ であった。KA31-d3 株より得られた *gtr1-3Δ* 変異アレルを持つ減数分裂分離株の rAPase 活性も同様に構成性表現型を示した。この結果より、*gtr1* 遺伝子破壊株では、抑制条件下での rAPase 生産能が上昇する事がわかった。しかし、脱抑制条件下ではすべての遺伝子破壊株の rAPase 生産能は、野生型株と同様のレベルであった。細胞増殖速度は、培地中のリン酸濃度に関係なく *gtr1* 遺伝子破壊株では野生型株に比べて遅くなった。これは、*pho84* 遺伝子破壊株の増殖速度が低リン酸培地中では遅くなるが、高リン酸培地中では野生株と差がないことと異なっている。これらの結果より、高リン酸培地における *gtr1 pho84* 二重変異株の増殖速度の低下は *gtr1* 遺伝子の破壊によると考えられる。

第4項 *gtr1* 遺伝子破壊株ではリン酸取り込み活性が低下している

低い *K_m* 値を示すリン酸取り込み系は、外界のリン酸濃度により調節されていることがわかっている (Tamai *et al.* 1985)。*gtr1* 遺伝子破壊株におけるリン酸取り込み活性を調べた結果 (図 27A)、高リン酸完全培地で培養を行った MB200 株 (*gtr1-1Δ*) では同じ培地で培養を行った PP2 株 (*GTR1*⁺) に比べて、リン酸取り

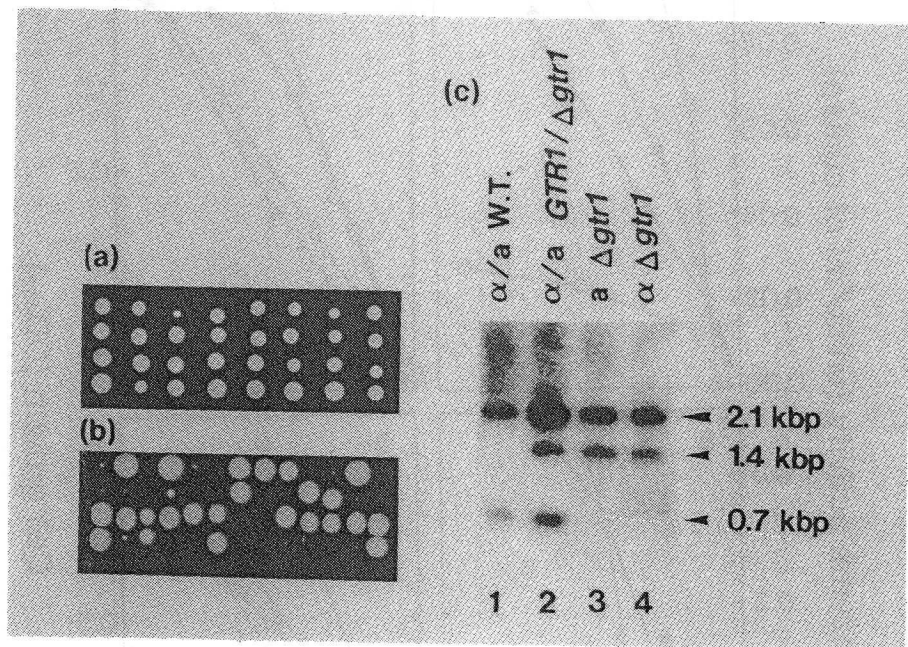


Fig. 25. Growth properties of tetrad spores having the *gtr1-3* Δ allele. Strains KA31 (A) and PP7 (B) were sporulated, dissected on a YPAD plate, and incubated at 30°C for 3 (A) or 7 (B) days. (C) Analysis of transformed strains. Total cellular DNA of each transformant was digested with *Hind*III and electrophoresed on 1% agarose gels. Southern blotting were probed with ³²P-labelled 1.1 kb *Acc*I fragment of pMB15. Strains: KA31 (*MATa*/*MAT* α *GTR1*⁺/*GTR1*⁺; lane 1), PP7 (*MATa*/*MAT* α *GTR1*⁺/*gtr1-3* Δ ; lane 2), PP8 (*MATa* *gtr1-3* Δ ; lane 3); PP9 (*MAT* α *gtr1-3* Δ ; lane 4).

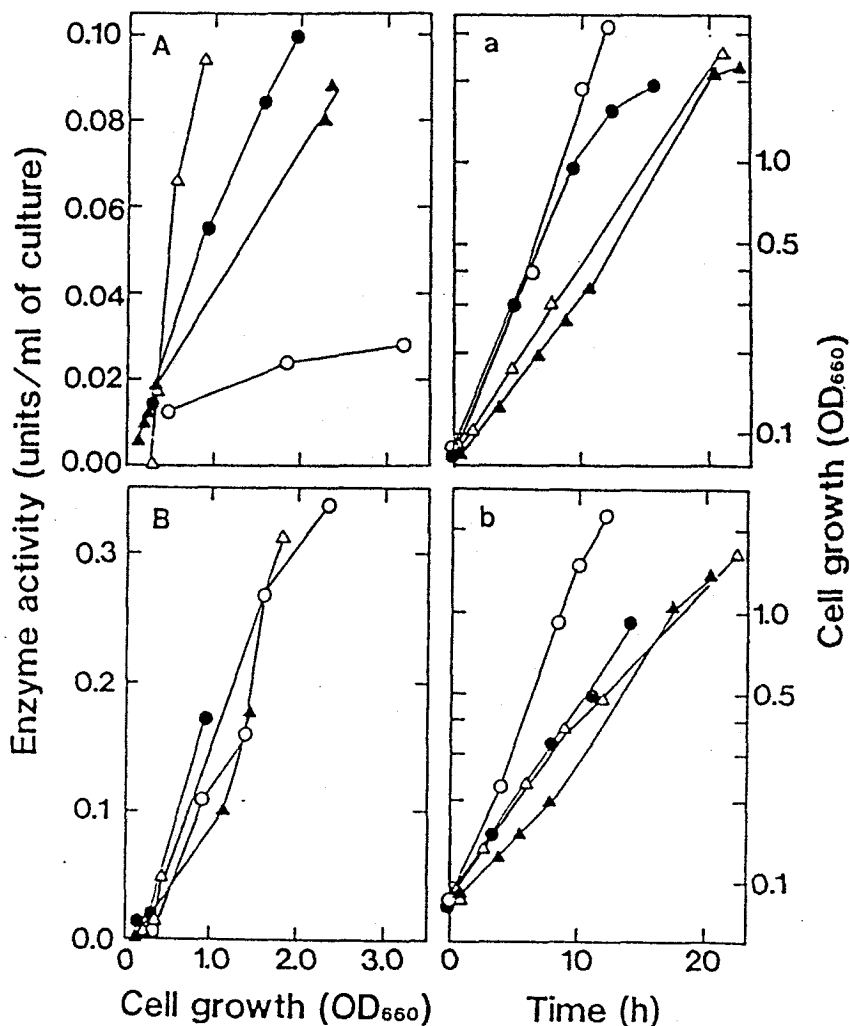


Fig. 26. Time courses of acid phosphatase synthesis in wild type, *gtr1-3Δ*, *pho84-1Δ*, and *gtr1-2Δ pho84-2Δ* strains. Cells cultivated in nutrient high-Pi media with shaking at 30°C for 24 h were harvested, washed, and suspended in the same volume of sterilized water. Volumes of 1-ml portion of the cell suspension were inoculated into 100-ml of synthetic complete high-Pi (A and a) or low-Pi (B and b) medium and shaken at 30°C. Acid phosphatase activity (A and B) as a function of cell growth (a and b; OD₆₆₀ of the cultures) was determined with intact cell suspension as an enzyme source. Strains and symbols: ○, PP2 (*GTR1*⁺ *PHO84*⁺); ▲, PP9 (*gtr1-3Δ* *PHO84*⁺); ●, MB203 (*GTR1*⁺ *pho84-1Δ*); and Δ, PP4 (*gtr1-2Δ pho84-2Δ*).

込み活性がおよそ 1/5 に低下していることがわかった。両菌株のグルコースおよび硫酸塩に対する取り込み活性を調べたが、両者に大きな差は認められなかった(図27B, 27C)。従って、*gtr1* 遺伝子破壊株は *pho84* 変異株と同じく、rAPase の構成的生産とリン酸取り込み活性の低下の表現型 (Ueda and Oshima 1975; Ueda et al. 1975)を示すことがわかった。さらに、ヒ酸耐性表現型を調べた結果、*gtr1* 遺伝子破壊株も *pho84* 変異株と同様に、ヒ酸耐性表現型を示した。

gtr1 遺伝子破壊株のリン酸取り込み活性が低下したため、この株における rAPase 生産表現型は構成性になると考えられる。*gtr1* 遺伝子破壊株のリン酸取り込み活性が低下する原因として、i) *GTR1* 遺伝子を破壊する際、*GTR1* 遺伝子座に挿入した *HIS3* または *URA3* 遺伝子が、*PHO84* 遺伝子のプロモーター機能を破壊した。ii) *Gtr1* タンパク質が *PHO84* 遺伝子の転写に必要である。iii) *Gtr1* タンパク質が、*Pho84* リン酸輸送体が機能するのに必要である、の 3 つの可能性が考えられる。これらの可能性を検討するために、*GTR1* 遺伝子だけを含み、*URA3* 遺伝子を選択符号に持つプラスミド pMB43 (図21) を MB200 株 (*gtr1-3Δ ura3*) に導入し、任意に選択した *Ura*⁺ 形質転換体の、rAPase 生産性および細胞増殖表現型を野生型株と比較した。その結果、*Ura*⁺ 形質転換体と野生型株との間で表現型に違いが認められなかったことより、i) の可能性は否定される。残り 2 つの可能性について検討するため、MB200 株 (*gtr1-1Δ*) における *PHO84* 遺伝子の転写量を調べた (図28)。低リン酸完全培地または高リン酸完全培地で 16 時間培養を行った PP2 株 (*GTR1*⁺)、MB200 株 (*gtr1-1Δ*) より回収した全 RNA に対して、³²P で標識した *PHO84* 遺伝子の ORF の一部を含む 564 bp *BgIII-XhoI* DNA断片をプローブに用いてノザン解析を行った。*GTR1*⁺ 株より調製した RNA 試料では低リン酸培地で培養を行ったときのみ、*PHO84* 遺伝子からの転写産物が検出されたが、*gtr1* 遺伝子破壊株では高リン酸培地で培養を行った菌株からの RNA に対しても、低いレベルではあるが、プローブとの結合シグナルが検出された (図28)。この結果は、*gtr1* 遺伝子破壊株においても *PHO84* 遺伝子の転写が行われることを示しており、ii) の可能性も否定できる。さらに、*gtr1* 遺伝子破壊株における *PHO84-lacZ* 融合遺伝子の発現を調べた。*PHO84-lacZ* 融合遺伝子を含むYCp 型プラスミド pMB142 (図1) を、PP2 (*GTR1*⁺ *PHO84*⁺) 株、MB200 (*gtr1-1Δ PHO84*⁺) 株、MB203 (*GTR1*⁺ *pho84-1Δ*) 株、PP4 (*gtr1-2Δ pho84-2Δ*) 株に導

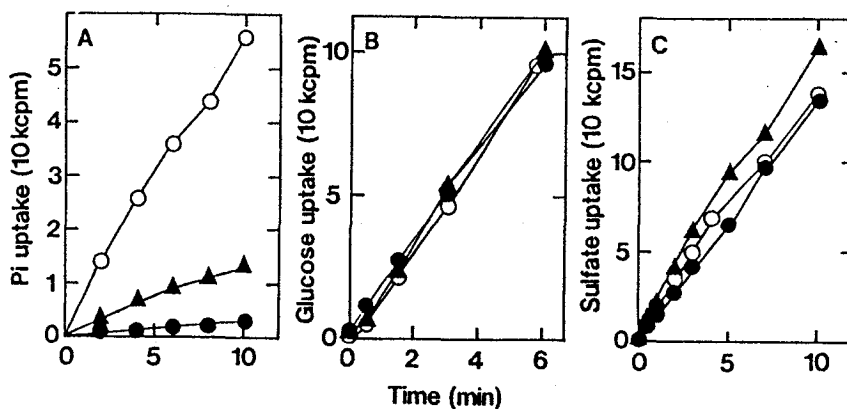


Fig. 27. P_i , glucose, and sulfate uptakes by cells of the *gtrl* disruptant. (A) Defect in P_i uptake of *gtrl-1Δ* cells. Cells to be tested were cultivated in YPAD to the stationary phase, washed, suspended in the same volume of sterilized water, inoculated into synthetic low- P_i medium supplemented with appropriate nutrients and shaken at 30°C. The cells were collected when they reached an OD_{660} of 1, washed, and inoculated into synthetic low- P_i medium at a cell concentration giving an $\text{OD}_{660} = 0.1$. The radioactivity of the medium was adjusted to 3.4×10^5 cpm per ml with $^{32}\text{P}_i$. Samples were taken from the reaction mixture at appropriate intervals and filtered through a nitrocellulose membrane filter and washed. The radioactivity on the filter was counted in a liquid scintillation counter (model LS 6000IC; Beckman Instrument, Inc., Fullerton, Calif.). The amount of P_i absorbed by the cells was expressed as cpm of ^{32}P radioactivity per ml in the cell suspension with an OD_{660} of 0.1. (B) Normal glucose uptake by *gtrl-1Δ* cells. Cells cultivated in YPAD to the stationary phase were suspended in the same volume of sterilized water and 1 ml of the

suspension was added to 100 ml of YP medium supplemented with 0.05% glucose and shaken for 14 h at 30°C. The cells were harvested, washed with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) at room temperature and resuspended in the same buffer at a cell concentration of about $OD_{580} = 15$. The suspension was mixed an appropriate amount of radioactive glucose (D-[U- ^{14}C]glucose; Amersham International Plc, Buckingham Shire, UK) and incubated at 30°C. Samples of 80 μ l were taken at appropriate intervals and filtered. The radioactivity on the filter was measured by the same procedure as for assay of P_i absorption. (C) Normal uptake of sulfate by gtr1-1 Δ cells. Cells cultivated in synthetic high- P_i medium to the stationary phase were washed twice with sulfate-deficient medium, resuspended in the same volume of sulfate-deficient medium, and shaken for 4 h at 30°C. The cells were harvested and resuspended in sulfate-deficient medium at a cell concentration of $OD_{660} = 1$. The suspension was mixed with and appropriate amount of radioactivity absorbed by the cells were determined as for assays of P_i and glucose uptakes. The strains tested were (O) PP2 (GTR1⁺ PHO84⁺), ($\blacktriangle$) MB200 (gtr1-1 Δ PHO84⁺), and ($\bullet$) MB203 (GTR1⁺ pho84-1 Δ).

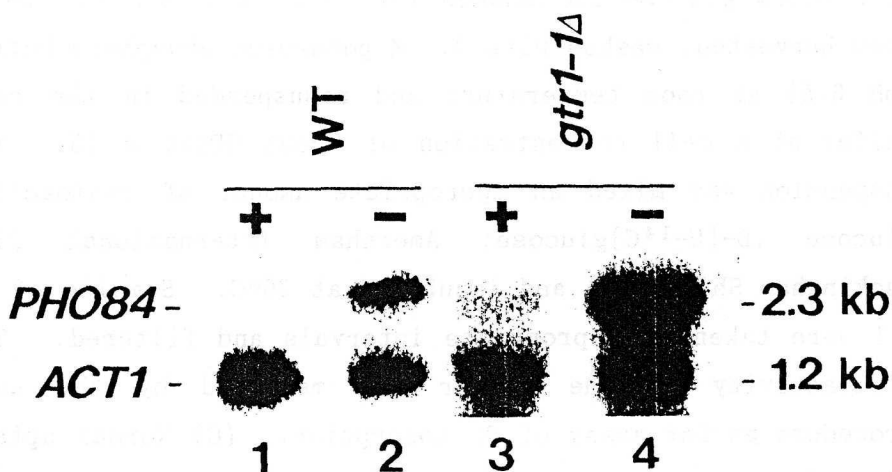


Fig. 28. Detection of PHO84 transcript in the wild type and gtr1 disruptant by Northern hybridization. Samples of 10 μ g of total RNAs prepared from cells of strains PP2 (GTR1⁺ [WT]; lanes 1 and 2), and MB200 (gtr1-1 Δ ; lanes 3 and 4) grown on nutrient high-P_i (lanes 1 and 3) or low-P_i (lanes 2 and 4) medium were charged in slots. The ³²P-labeled 564-bp BglIII-XhoI fragment of PHO84 DNA and a 1.0-kb HindIII-XhoI fragment of S. cerevisiae encoding the ACT1 gene were used as probes for detection of the PHO84 and ACT1 transcript, respectively. The specific activities of probes were 1.0 x 10⁸ cpm per μ g of DNA. 25S and 18S rRNAs visualized by staining with ethidium bromide were used as size markers as described by Philippsen et al. (1978).

Table 6. β -Galactosidase activity in transformant harboring a YCp plasmid, pMB142, bearing the PHO84-lacZ fused gene

Strain	Relevant genotype	β -Galactosidase activity ^a in	
		high-P _i	low-P _i
PP2	<u>GTR1</u> ⁺ <u>PHO84</u> ⁺	3.3 $\pm$ 0.3	830 $\pm$ 25
MB200	<u>gtr1-1</u> Δ <u>PHO84</u> ⁺	455 $\pm$ 28	525 $\pm$ 73
MB203	<u>GTR1</u> ⁺ <u>pho84-1</u> Δ	1050 $\pm$ 69	1510 $\pm$ 95
PP4	<u>gtr1-2</u> Δ <u>pho84-2</u> Δ	509 $\pm$ 20	784 $\pm$ 54

^a β -Galactosidase activities are expressed in units per mg of protein.

Values are means for triplicate determinations.

入し、Ura⁺ 形質転換体を取得した。その形質転換体を低リン酸培地または高リン酸培地で定常期まで培養を行い、その時の β -ガラクトシダーゼ活性を測定した(表6)。その結果、*GTR1* 遺伝子と *PHO84* 遺伝子の少なくとも一方を破壊した株では野生型株に比べて高リン酸培地における酵素活性値が非常に高くなった。以上の結果は、*gtr1* 遺伝子破壊株ではリン酸取り込み活性が低下したため、*PHO84* 遺伝子の発現が脱抑制を受けて構成性になるとの考えと矛盾しない。これらの結果より、Gtr1 タンパク質は Pho84 リン酸輸送体と協調してリン酸取り込み系に関与すると結論した。

第4節 考察

rAPase 構成性表現型を示す変異は次の3つのクラスに分けることができる。

i) *PHO4*^c, *pho80*, *pho85* などの rAPase 合成の制御に関与する遺伝子の変異 (Ueda *et al.* 1975; Toh-e and Oshima 1974)、ii) *PHO83* 変異における *PHO5* 遺伝子の 5' 非翻訳領域への Ty 遺伝子の挿入変異 (Toh-e *et al.* 1983)、iii) リン酸取り込み系の変異と考えられる *pho84* 変異 (Ueda and Oshima 1975)。*gtr1* 遺伝子破壊株では *pho84* 変異株と同様にリン酸取り込み活性が低下し、ヒ酸耐性および rAPase 構成性表現型を示す事より、*gtr1* 変異は *pho84* 変異と同じクラ

スに分類されると考えられる。

塩基配列より推測される Gtr1 タンパク質のアミノ酸配列には ras および ras 関連タンパク質と N末端領域で相同性がみられ、GTP との結合に必要な領域がほぼ完全に保存されていた。しかし、3 番目の領域で保存されているアスパラギンまたはトレオニンが、Gtr1 ではヒスチジンに代わっていた。H-ras においては、保存されているアスパラギンをヒスチジンに換えた変異タンパク質では GTP に対する結合能が弱くなることがわかっている (Der *et al.* 1986)。この事実から考えれば Gtr1 タンパク質での GTP に対する結合能は弱いかもしれない。

gtr1 破壊株ではリン酸取り込み活性が低下したが、この現象より考えられる Gtr1 の機能として 2 つあげられる。1 つは *PHO84* 遺伝子がコードするリン酸輸送体の調節に関与している可能性である。GTP 結合タンパク質の中には、イオンチャネルの開閉に必要なもの、あるいは膜電位などの刺激を伝達してイオンチャネルを開くのに関与するものが知られている (Brown and Birnbaumer 1990)。Gtr1 タンパク質が何らかの信号を受けて、それを Pho84 タンパク質に伝達する可能性もあろう。この考えによれば、*gtr1* 破壊株では、リン酸取り込み活性が低下するため、Gtr1 タンパク質は Pho84 リン酸輸送体に対して正に働く GTP 結合タンパク質であると思われる。もう一つは Pho84 タンパク質の細胞内での輸送に関与するとの可能性である。GTP 結合タンパク質の中には、Sec4 (Salminen and Novick 1987) や Ypt1 (Gallwitz *et al.* 1983) などのように、細胞内タンパク質輸送に働くものが知られている。もし、Gtr1 タンパク質が細胞内タンパク質輸送に関与しているとしても、*gtr1* 破壊株は生育可能であるので、一般的な輸送ではなく、ある特定のタンパク質の輸送に必要であると思われる。

gtr1 破壊株ではリン酸濃度に関わらず増殖速度が遅いが、このことは低リン酸条件でのみ遅くなる *pho84* 変異株とは異なり、Gtr1 タンパク質が高親和性の P_i 取り込み系だけでなく、低親和性の取り込み系にも関与している可能性を示唆している。*gtr1* または *pho84* 単独変異よりも二重変異株の方が rAPase 活性が高い事もこの考えと矛盾しない。

第5節 要約

リン酸輸送体をコードすると考えられる *PHO84* 遺伝子上流に GTP 結合タンパク質をコードする *PHO84* 遺伝子とは逆向きに転写される ORF を見だし、*GTR1* と命名した。*gtr1* 破壊株は rAPase 構成性、ヒ酸耐性、そしてリン酸取り込み活性低下の *pho84* 変異株と同じ表現型を示した。*gtr1* 破壊株において、*PHO84* 遺伝子の転写や翻訳に欠損が見られなかったことより、これらの表現型が *gtr1* 遺伝子破壊によるリン酸取り込み活性の低下のため引き起こされたと考えられ、Gtr1 タンパク質は Pho84 タンパク質の機能に翻訳段階以後で関与していると考えた。

総合考察

本研究では、*S. cerevisiae* のリン酸取り込みに関与する遺伝子群の解析を行った。Pho84 タンパク質は、リン酸輸送体をコードし、その発現は外界のリン酸濃度により制御されることを明らかにした。また、リン酸取り込み系が機能する際に、Pho84 タンパク質と協調して、Gtr1, Pho86, Pho87 など、複数のタンパク質が必要であることを示すことができた。*E. coli* におけるリン酸取り込み系では、リン酸により抑制を受ける Pst 系と構成的に働く Pit 系の存在が知られている (Rao and Torriani 1990)。*S. cerevisiae* の場合も、リン酸による抑制を受ける系と構成的な系があると考えられ (Tamai *et al.* 1985)、リン酸による抑制を受ける Pho84 系は Pst 系に相当するものと考えることができる。Pst 系では、ペリプラズム領域に存在するリン酸結合タンパク質である PstS タンパク質と結合したリン酸が、膜内在性の PstA, PstC 両タンパク質と、膜表在性の PstB タンパク質の複合体との相互作用を介して、細胞膜を透過すると考えられている (Rao and Torriani 1990)。Pho84 タンパク質と Pst 系のタンパク質のアミノ酸配列の間には相同性はみられなかったが、*S. cerevisiae* のリン酸取り込みに関係するタンパク質群が、実際に複合体を形成している可能性は十分考えられる。

E. coli では、Pst 系の遺伝子産物の一つが、リン酸レギュロンにおける外界のリン酸濃度変化を検知していると考えられている (Rao and Torriani 1990)。その理由の一つとして、高リン酸および低リン酸条件で培養を行った *E. coli* の、細胞内リン酸濃度が変化していないことがあげられる (Rosenberg 1987)。外界のリン酸濃度に応じて、Pst 系と Pit 系が連携して機能するため、細胞内リン酸濃度は常に一定に保たれているのである。しかし、それにもかかわらず、Pst 系の変異株が、高リン酸条件下でホスファターゼ構成性表現型を示すことより、Pst 系から酵素生産に対して、負に働く信号が核内に伝えられると考えなければならない。この時、核内に伝えられた信号は、リン酸そのものとは考えられない。酵母においても、Pho84 系を介してリン酸の有無の信号が核内に伝えられている可能性を示唆するデータとして、次の事実があげられる。i) リン酸に対する親和性の違いにより少なくとも二つのリン酸取り込み系が存在する (Tamai *et al.* 1985)。

高リン酸条件では構成的な系がリン酸を取り込み、低リン酸条件では抑制的な系が脱抑制されてリン酸を取り込むことで、*E. coli* の場合と同様に、酵母細胞内のリン酸濃度が外界のリン酸濃度にかかわらず一定に保たれている可能性がある。

ii) *pho84* 遺伝子破壊株の増殖速度が、低リン酸培地では野生型株に比べて非常に遅くなるにもかかわらず、高リン酸培地では野生株とほとんど変わらない (図 26)。低リン酸培地における *pho84* 変異株の増殖速度の低下が、細胞内リン酸の欠乏によるとすれば、高リン酸培地では *pho84* 変異株においても、増殖には十分な量のリン酸が細胞内に存在すると思われる。

iii) *PHO84* 遺伝子の転写産物が、高リン酸条件下では検出できなかった (図 7)。つまり高リン酸条件下では *Pho84* 系の機能はあまり必要ではない可能性がある。以上の事実より、高リン酸条件下では、*pho84* 変異細胞内のリン酸濃度が、野生型株と比べて大きな差がないことも予想される。これまで、*pho84* 変異株ではリン酸取り込み活性が低下したため、細胞内リン酸濃度が下がり、高リン酸培地中でも細胞内は低リン酸状態となり、そのため *pho84* 変異株は *rAPase* 構成性表現型を示すと考えられてきた。また、野生株が低リン酸培地で *rAPase* を生産する理由も、細胞内リン酸濃度が低下したためと考えられてきた。しかし、生物にとってリン酸は生育に必須の物質であり、恒常性の維持という点からも、*Pho84* タンパク質が細胞外のリン酸濃度の検知に関与し、その信号を細胞内に伝達する機構が存在すると考えることも可能と思われる。*Pho84* 系より信号が伝えられると仮定したとき、リン酸濃度の検知に関与する可能性のある因子として、*SEF* 遺伝子産物があげられる。*sef* 変異の中には、*pho84* 変異株の *rAPase* 構成性表現型は抑圧するが、*sef6* 変異のようにヒ酸耐性表現型は抑圧できないものがある。そうした *sef* 変異株では、リン酸取り込み活性が上昇したとは考えにくく、信号伝達系に異常が起こった株かもしれない。変異株では、リン酸濃度の検知系が異常であったが、*sef* 変異により正常状態に戻り、*rAPase* 生産も抑制性になったと考えられる。*Pho84* 系が信号伝達に関与する可能性を検討する手段として、酵母以外のリン酸輸送体をコードする遺伝子の翻訳可能領域を、リン酸制御を受けず *S. cerevisiae* で機能するプロモーターの下流につなぎ、*pho84* 変異株で発現させた時に、リン酸輸送体が酵母細胞中で機能し、リン酸を細胞内に取り込むことが可能であれば、その株における *rAPase* 産生表現型を調べる方法がある。もし、信号が伝わっていれば、新しいリ

ン酸輸送体によりリン酸取り込みが回復しても、rAPase 生産構成性表現型のままである。しかし、信号伝達に関与していなければ、rAPase 生産は抑制性になると考えられる。

Pho84 タンパク質の一次構造を塩基配列より推定したところ、細菌や酵母、そして高等生物の糖輸送体と相同性が見られた。アミノ酸一次配列の解析より、これらの糖輸送体は膜に組み込まれており、膜内での立体構造はいずれも膜を 6 回横切る構造を一つの単位として、それが 2 回繰り返す、計 12 回の α ヘリックス構造を持っていると推定されている (Gould and Bell 1990)。Pho84 タンパク質も一次配列の解析より同じ構造をとることが示唆された。これら糖輸送体は構造が似ているにもかかわらずその輸送様式には促進輸送と能動輸送が混在している。さらに、アミノ酸レベルでの相同性は見られないが、膜における立体構造が 6 回ヘリックス - ループ - 6 回ヘリックス構造と推定されるものとして、ほ乳類のアデニル酸シクラーゼ (Krupinski *et al.* 1989)、多剤耐性 *MDR1* 遺伝子産物 (Chenet *et al.* 1986)、そして *S. cerevisiae* の Ste6 タンパク質 (McGrath and Valshavsky 1989) が見つかっている。*MDR1* 遺伝子産物は、エネルギー依存性薬剤排出ポンプの機能を持つことが明らかになっている (Gottesman and Pastan 1988)。Ste6 タンパク質は α -ファクターの分泌に関与すると考えられている (McGrath and Varshavsky 1989)。このように、こうした構造が糖やリン酸の取り込みだけでなく、分泌や排出に関与するタンパク質にも見いだされることより、膜における物質透過に関与するタンパク質の一般的な基本構造の一つとして、広く生物に存在すると思われる。

GTR1 遺伝子がコードする GTP 結合タンパク質がリン酸取り込み系に関与することを示唆するデータを得た。一般に GTP 結合タンパク質は GTP あるいは GDP と結合することで ON-OFF 信号を表現している。*gtr1* 変異株では *pho84* 変異株とは異なり、高リン酸条件下においても増殖速度の低下が見られた。このことより、Gtr1 タンパク質が他のリン酸取り込み系にも関与している可能性が考えられる。たとえば、Gtr1 タンパク質は、二つの取り込み系の調節に関与し、高リン酸条件下では Pho84 系を抑制し、もう一方を活性化させるスイッチとして働くとの考えである。*gtr1* 変異株では、低リン酸条件下におけるリン酸取り込み活性は、野生型株と比べて 1/5 に低下していたが、高リン酸条件下のリン酸取り込み活性

と比べると、リン酸取り込み系の脱抑制能はまだ残っていた。Gtr1 タンパク質がリン酸取り込み系を選択するスイッチとして働くとすれば、*gtr1* 遺伝子破壊株において、リン酸取り込み活性が弱いながら脱抑制する現象とは矛盾する。しかし、Gtr1 タンパク質のホモログが酵母細胞内に存在すると考えれば、説明が可能である。この考えは、*gtr1* 遺伝子破壊株が致死表現型を引き起こさないことと一致する。

pho84 変異を抑圧する *sef4* 変異が、*PHO81* 遺伝子座の変異であることを見いだしたことより、Pho81 産物と Pho84 産物との間に相互作用がある可能性が示唆された。さらに、Pho81 アミノ酸配列には、アンキリン繰り返し配列が存在する事が見いだされた (H. Sentenac 私信)。アンキリンは赤血球にある細胞膜の裏打ちタンパク質で、膜内在性タンパク質と細胞骨格とを結び付ける働きをされると考えられている (Lux *et al.* 1990)。そしてアンキリンのアミノ酸配列中には、33 アミノ酸からなる 22 回の繰り返し構造が見いだされている (Lux *et al.* 1990)。この繰り返し配列の機能はわかっていないが、これと相同性のある配列が Pho81 タンパク質内にあることから、Pho81 タンパク質が膜内在性タンパク質、たとえば Pho84 タンパク質と直接結合しているかも知れない。Pho84 系の複合体からの信号が、その複合体に含まれる Pho81 タンパク質へ伝えられ、さらにそれが Pho80, Pho4 タンパク質に伝わり、構造遺伝子の発現にいたるという信号伝達系が考えられる。これまで、遺伝子発現調節系の解析の多くは転写開始機構について行われており、環境変化の認識とその情報の酵素構造遺伝子への伝達過程は、まだ大部分が不明である。外界の環境変化の認識とその情報伝達過程の解明に、本研究で解析した Pho84 タンパク質を中心としたリン酸取り込み系は格好のモデルになると考えられる。本研究の知見が今後の遺伝子発現調節機構の解明に役立つ事を期待している。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御指導を賜りました、大阪大学工学部、大嶋泰治教授に心から感謝いたします。本論文の作製にあたり、有益な御助言と御教示を賜りました大阪大学工学部、高野光男教授、山田靖宙教授、菅健一教授、今中忠行教授、大阪大学生物工学国際交流センター、吉田敏臣教授、ならびに大阪大学産業科学研究所、二井將光教授に感謝の意を表します。

本研究に際し、直接懇切なる御指導を賜りました大阪大学工学部、原島俊助教授に深く感謝いたします。

研究の内容および姿勢に関して適切な御助言と御講評を賜りました高田信男先生（現、大谷女子短期大学）、大阪大学工学部、関達治助教授、大阪大学微生物病研究所、荒木弘之助教授、大阪大学工学部、吉田和哉博士、小川暢男博士に感謝いたします。*gal80* 遺伝子破壊株を分与して頂きました慶応大学医学部、深沢俊夫教授、鈴木ゆり子博士、ならびに *PH087* 遺伝子存在領域に該当するファージクローンを分与して頂きました、神戸大学理学部、磯野克巳教授に感謝いたします。

本研究の初期に、熱心にご指導頂きました中出真嗣氏（現、小野薬品工業株式会社）に感謝いたします。本研究の共同研究者として御協力頂きました北村宇一郎氏（現、住友銀行）、西村衛氏（現、アサヒビール株式会社）、斉藤洋之氏（現、キリンビール株式会社）、中川智之氏（現、住友生命）、鎗木夕美氏（現、日本IBM）に厚く御礼を申し上げます。また、博士課程在学中有益な御助言、御討論頂きました、林直之博士（現、テキサス大学）、入江賢児氏（現、名古屋大学理学部）、ならびに向由起夫氏をはじめとする大嶋研究室の皆様感謝します。

参考文献

- Ambudkar, S. V., V. Anantharam, and P. C. Maloney. 1990. UhpT, the sugar phosphate antiporter of Escherichia coli, functions as a monomer. *J. Biol. Chem.* 265:12287-12292.
- Arndt, K. T., C. Styles, and G. R. Fink. 1987. Multiple global regulators control HIS4 transcription in yeast. *Science* 237:874-880.
- Bach, M.-L., F. Lacroute, and D. Botstein. 1979. Evidence for transcriptional regulation of orotidine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:386-390.
- Balch, W. E. 1990. Small GTP-binding proteins in vesicular transport. *Trends Biochem. Sci.* 15:473-477.
- Barbacid, M. 1987. ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56:779-827.
- Bennett, R. L., and M. H. Malamy. 1970. Arsenate resistant mutants of Escherichia coli and phosphate transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40:496-503.
- Berger, S. L., W. D. Cress, A. Cress, S. J. Triezenberg, and L. Guarente. 1990. Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* 61:1199-1208.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H., and P. H. J. Peters. 1987. Phosphate uptake in Saccharomyces cerevisiae, p. 205-209. In A. Torriani-Gorini, F. G. Rothman, S. Silver, A. Wright, and E. Yagil (ed.), *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders, and F. McCormick. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature (London)* 349:117-127.
- Bowman, B. J., K. E. Allen, and C. W. Slayman. 1983. Vanadate-resistant mutants of Neurospora crassa are deficient in a high-affinity phosphate transport system. *J. Bacteriol.* 153:292-296.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Braus, G., H.-U. Mosch, K. Vogel, A. Hinnen, and R. Hutter. 1989. Interpathway regulation of the TRP4 gene of yeast. *EMBO J.* 8:939-945.

- Brown, A. M., and L. Birnbaumer. 1990. Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Annu. Rev. Physiol.* 52:197-213.
- Casadaban, M. J., A. Martinez-Arias, S. K. Shapira, and J. Chou. 1983. β -Galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in Escherichia coli and yeast. *Methods Enzymol.* 100:293-308.
- Celenza, J. L., L. Marshall-Carlson, and M. Carlson. 1988. The yeast SNF3 gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2130-2134.
- Chant, J., K. Corrado, J. R. Pringle, and I. Herskowitz. 1991. Yeast BUD5, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene BEM1. *Cell* 65:1213-1224.
- Cheng, Q., and C. A. Michels. 1989. The maltose permease encoded by the MAL61 gene of Saccharomyces cerevisiae exhibits both sequence and structural homology to other sugar transporters. *Genetics* 123:477-484.
- Chen, C-j., J. E. Chin, K. Ueda, D. P. Clarke, I. Pastan, M. M. Gottesman, and I. B. Roninson. 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47:381-389.
- Chu, G., D. Vollrath, and R. W. Davis. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234:1582-1585.
- Clarke, L., and J. Carbon. 1978. Functional expression of cloned yeast DNA in Escherichia coli: specific complementation of argininosuccinate lyase (argH) mutations. *J. Mol. Biol.* 120:517-532.
- Clewell, D. B., and D. R. Helinski. 1969. Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli: purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62:1159-1166.
- Cooper, T. G. 1982. Transport in Saccharomyces cerevisiae, p.399-461. In J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, N.Y.
- Der, C. J., B.-T. Pan., and G. M. Cooper. 1986. ras^H mutants deficient in GTP binding. *Mol. Cell. Biol.* 6:3291-3294.
- Eisenberg, D. 1984. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 53:595-623.
- Ferreira, G. C., R. D. Pratt, and P. L. Pedersen. 1989. Energy-linked anion transport: cloning, sequencing, and characterization of a full length cDNA encoding the rat liver mitochondrial proton/phosphate symporter. *J. Biol. Chem.* 264:15628-15633.

- Gaber, R. F., C. A. Styles, and G. R. Fink. 1988. TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 8:2848-2859.
- Gallwitz, D., C. Donath, and C. Sander. 1983. A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product. *Nature (London)* 306:704-707.
- Gallwitz, D., and I. Sures. 1980. Structure of a split yeast gene: complete nucleotide sequence of the actin gene in Saccharomyces cerevisiae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2546-2550.
- Gibbs, J. B., and M. S. Marshall. 1989. The ras oncogene - an important regulatory element in lower eucaryotic organisms. *Microbiol. Rev.* 53:171-185.
- Gottesman, M. M., and I. Pastan. 1988. The multidrug transporter, a double-edged sword. *J. Biol. Chem.* 263:12163-12166.
- Gould, G. W., and G. I. Bell. 1990. Facilitative glucose transporters: an expanding family. *Trends Biochem. Sci.* 15:18-23.
- Hancock, J. F., A. I. Magee, J. E. Childs, and C. J. Marshall. 1989. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell.* 57:1167-1177.
- Harashima, S., A. Takagi, and Y. Oshima. 1984. Transformation of protoplasted yeast cells is directly associated with cell fusion. *Mol. Cell. Biol.* 4:771-778.
- Hayashi, N., and Y. Oshima. 1991. Specific cis-acting sequence for PHO8 expression interacts with PHO4 protein, a positive regulatory factor, in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 11:785-794.
- Hereford, L., K. Fahrner, J. Jr. Woodford, M. Roshhosh, and D. B. Kaback. 1979. Isolation of yeast histon gene H2A and H2B. *Cell* 18:1261-1271.
- Hinnebusch, A. G. 1988. Mechanisms of gene regulation in general control of amino acid biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol. Rev.* 52:248-273.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153:163-168.
- Jensen, R., F. Jr. Sprague, and I. Herskowitz. 1983. Regulation of yeast mating-type interconversion: feedback control of H0 gene expression by the mating-type locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3035-3039.
- Jinks-Robertson, S., and T. D. Petes. 1986. Chromosomal translocations generated by high-frequency meiotic recombination between repeated yeast genes. *Genetics* 114:731-752.
- Johnson, D. L. 1971. Simultaneous determination of arsenate and phosphate in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 5:411-414.

- Johnston, M. 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of Saccharomyces cerevisiae. Microbiol. Rev. 51:458-476.
- Kaneko, Y., A. Toh-e, and Y. Oshima. 1982. Identification of the genetic locus for the structural gene and a new regulatory gene for the synthesis of repressible alkaline phosphatase in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 2:127-137.
- Kanik-Ennulat, C., and N. Neff. 1990. Vanadate-resistant mutants of Saccharomyces cerevisiae show alterations in protein phosphorylation and growth control. Mol. Cell. Biol. 10:898-909.
- Kawasaki, H., H. Matsuzaki, R. Nakajima, and Y. Oshima. 1991. The PHO80/TUP7 locus in Saccharomyces cerevisiae is on the left arm of chromosome XV: mapping by chromosome engineering. Yeast 7:859-865.
- Kruckeberg, A. L., and L. F. Bisson. 1990. The HXT2 gene of Saccharomyces cerevisiae is required for high-affinity glucose transport. Mol. Cell. Biol. 10:5903-5913.
- Krupinski, J., F. Coussen, H. A. Bakalyar, W-J. Tang, P. G. Feinstein, K. Orth, C. Slaughter, R. R. Reed, A. G. Gilman. 1989. Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. Science 244:1558-1564.
- Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. 157:105-132.
- Lehle, L., and E. Bause. 1984. Primary structural requirements for N- and O-glycosylation of yeast mannoproteins. Biochim. Biophys. Acta 799:246-251.
- Lewis, D. A., and L. F. Bisson. 1991. The HXT1 gene product of Saccharomyces cerevisiae is a new member of the family of hexose transporters. Mol. Cell. Biol. 11:3804-3813.
- Lindgren, G., L. Y. Hwang, Y. Oshima, and C. Lindgren. 1965. Genetical mutants induced by ethyl methanesulfonate in Saccharomyces. Can. J. Genet. Cytol. 7:491-499.
- Lux, E. S., K. M. John, and V. Bennet. 1990. Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. Nature (London) 344:36-42.
- Maiden, M. C. J., E. O. Davis, S. A. Baldwin, D. C. M. Moore, and P. J. F. Henderson. 1987. Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. Nature (London) 325:641-643.
- Maniatis, T., A. Jeffery, and D. G. Kleid. 1975. Nucleotide sequence of the rightward operator of phage λ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:1184-1188.
- Mann, B. J., B. J. Bowman, J. Grotelueschen, and R. L. Metzenberg. 1989. Nucleotide sequence of pho-4', encoding a phosphate-repressible phosphate permease of Neurospora crassa. Gene

83:281-289.

- Marinus, M. G., and N. R. Morris. 1975. Pleiotropic effects of a DNA adenine methylation mutation (dam-3) in Escherichia coli K12. *Mutat. Res.* 28:15-26.
- Matsuzaki, H., R. Nakajima, J. Nishiyama, H. Araki, and Y. Oshima. 1990. Chromosome engineering in Saccharomyces cerevisiae by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid. *J. Bacteriol.* 172:610-618.
- McGrath, J. P., and A. Varshavsky. 1989. The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature (London)* 340:400-404.
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101:20-78.
- Milburn, M. V., L. Tong, A. M. DeVos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, and S.-H. Kim. 1990. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 247:939-945.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Morrison, D. A. 1977. Transformation in Escherichia coli: cryogenic preservation of competent cells. *J. Bacteriol.* 132:349-351.
- Mortimer, R. K., D. Schild., C. R. Contopoulou, and J. A. Kans. 1989. Genetic map of Saccharomyces cerevisiae, Edition 10. *Yeast* 5:321-403.
- Mueckler, M., C. Caruso, S. A. Baldwin, M. Panico, I. Blench, H. R. Morris, W. J. Allard, G. E. Lienhard, and H. F. Lodish. 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229:941-945.
- Nechay, B. R. 1984. Mechanisms of action of vanadium. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24:501-524.
- Nishiwaki, K., N. Hayashi, S. Irie, D.-H. Chung, S. Harashima, and Y. Oshima. 1987. Structure of the yeast HIS5 gene responsive to general control of amino acid biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 208:159-167.
- Ogawa, N., and Y. Oshima. 1990. Functional domains of a positive regulatory protein, PHO4, for transcriptional control of the phosphatase regulon in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 10:2224-2236.
- Orr-Weaver, T. L., J. W. Szostak, and R. J. Rothstein. 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6354-6358.
- Oshima, Y. 1991. Impact of the Douglas-Hawthorne model as a paradigm for elucidating cellular regulatory mechanism in fungi -Perspectives-. *Genetics* 128:195-201.
- Parent, S. A., C. M. Fenimore, and K. A. Bostian. 1985. Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequences in S. cerevisiae. *Yeast* 1:83-138.

- Perkins, D. D. 1949. Biochemical mutants of the smut fungus Ustilago maydis. *Genetics* 34:607-626.
- Philippson, P., M. Thomas, R. A. Kramer, and R. W. Davis. 1978. Unique arrangement of coding sequences for 5S, 5.8S, 18S and 25S ribosomal RNA in Saccharomyces cerevisiae as determined by R-loop and hybridization analysis. *J. Mol. Biol.* 123:387-404.
- Rao, N. N., and A. Torriani. 1990. Molecular aspects of phosphate transport in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* 4:1083-1090.
- Ray, B. L., C. I. White, and J. E. Haber. 1991. The TSM1 gene of Saccharomyces cerevisiae overlaps the MAT locus. *Curr. Genet.* 20:25-31.
- Rose, M., M. J. Casadaban, and K. A. Bostian. 1981. Yeast genes fused to β -galactosidase in Escherichia coli can be expressed normally in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2157-2161.
- Rose, M. D., P. Novick, J. H. Thomas, D. Botstein, and G. R. Fink. 1987. A Saccharomyces cerevisiae genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* 60:237-243.
- Rosenberg, H. 1987. Phosphate transport, p. 205-208. In B. P. Rosen and S. Silver (ed.), *Ion transport in prokaryotes*. Academic Press, Inc., New York.
- Rothstein, R. J. 1983. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* 101:202-211.
- Salminen, A., and P. J. Novick. 1987. A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* 52:915-924.
- Sanger, F. 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214:1205-1210.
- Schatz, P. J., L. Pillus, P. Grisafi, F. Solomon, and D. Botstein. 1986a. Two functional α -tubulin genes of the yeast Saccharomyces cerevisiae encode divergent proteins. *Mol. Cell. Biol.* 6:3711-3721.
- Schatz, P. J., F. Solomon, and D. Botstein. 1986b. Genetically essential and nonessential α -tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. *Mol. Cell. Biol.* 6:3722-3733.
- Sherman, F., G. R. Fink, and J. B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Struhl, K. 1985. Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8419-8423.
- Szkutnicka, K., J. F. Tschopp, L. Andrews, and V. P. Cirillo. 1989. Sequence and structure of the yeast galactose transporter. *J. Bacteriol.* 171:4486-4493.
- Tamai, Y., A. Toh-e, and Y. Oshima. 1985. Regulation of inorganic

- phosphate transport systems in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 164:964-968.
- Tanaka, T., and B. Weisblum. 1975. Construction of a colicin E1-R factor comosite plasmid in vitro: means for amplification of deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 121:354-362.
- Thiel, T. 1988. Phophate transport and arsenate resitance in the cyanobacterium Anabaena variabilis. J. Bacteriol. 170:1143-1147.
- Thierry, A., C. Fairhead, and B. Dujon. 1990. The complete sequence of the 8.2 kb segment left of MAT on chromosome III reveals five ORFs, including a gene for a yeast ribokinase. Yeast 6:521-534.
- Tice-Baldwin, K., G. R. Fink, and K. T. Arndt. 1989. BAS1 has a Myb motif and activates HIS4 transcription only in combination with BAS2. Science 246:931-935.
- Toh-e, A., Y. Kaneko, J. Akimaru, and Y. Oshima. 1983. An insertion mutation associated with constitutive expression of repressible acid phosphatase in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 191:339-346.
- Toh-e, A., and Y. Oshima. 1974. Characterization of a dominant, constitutive mutation, PHOO, for the repressible acid phosphatase synthesis in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 120:608-617.
- Toh-e, A., and T. Shimauchi. 1986. Cloning and sequencing of the PHO80 gene and CEN15 of Saccharomyces cerevisiae. Yeast 2:129-139.
- Toh-e, A., Y. Ueda, S. Kakimoto, and Y. Oshima. 1973. Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 113:727-738.
- Tschopp, J. F., S. D. Emr, C. Field, and R. Schekman. 1986. GAL2 codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 166:313-318.
- Ueda, Y., and Y. Oshima. 1975. A constitutive mutation, phoT, of the repressible acid phosphatase synthesis with inability to transport inorganic phosphate in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 136:255-259.
- Ueda, Y., A. Toh-e, and Y. Oshima. 1975. Isolation and characterization of recessive, constitutive mutations for repressible acid phosphatase synthesis in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 122:911-922.
- Vidal, M., A. M. Buckley, F. Hilger, and R. F. Gaber. 1990. Direct selection for mutants with increased K⁺ transport in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 125:313-320.
- Vieira, J., and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. Methods Enzymol. 153:3-11.
- Vogel, K., W. Horz, and A. Hinne. 1989. The two positively acting regulatory proteins PHO2 and PHO4 physically interact with PHO5 upstream activation regions. Mol. Cell. Biol. 9:2050-2057.

- Walmsley, A. R. 1988. The dynamics of the glucose transporter. *Trends Biochem. Sci.* 13:226-231.
- Wickner, R. B. 1987. MKT1, a nonessential Saccharomyces cerevisiae gene with a temperature-dependent effect on replication of M2 double-stranded RNA. *J. Bacteriol.* 169:4941-4945.
- Willsky, G., J. Leung, P. Offerman, E. Plotnick, and S. Dosch. 1985. Isolation and characterization of vanadate-resistant mutants of Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.* 164:611-617.
- Willsky, G. R., and M. H. Malamy. 1980. Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 144:366-374.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
- Yeramian, P., P. Chardin, P. Madaule, and A. Tavitian. 1987. Nucleotide sequence of human rho cDNA clone 12. *Nucleic Acids Res.* 15:1869.
- Yoshida, K., Z. Kuromitsu, N. Ogawa, K. Ogawa, and Y. Oshima. 1987. Regulatory circuit for phosphatase synthesis in Saccharomyces cerevisiae, p. 49-55. In A. Torriani-Gorini, F. G. Rothman, S. Silver, A. Wright, and E. Yagil (ed.), *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Yoshida, K., Z. Kuromitsu, N. Ogawa, and Y. Oshima. 1989a. Mode of expression of the positive regulatory genes PHO2 and PHO4 of the phosphatase regulon in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Gen. Genet.* 217:31-39.
- Yoshida, K., N. Ogawa, and Y. Oshima. 1989b. Function of PHO regulatory genes for repressible acid phosphatase synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Gen. Genet.* 217:40-46.
- Yoshikawa, A., and K. Isono. 1990. Chromosome III of Saccharomyces cerevisiae: An ordered clone bank, a detailed restriction map and analysis of transcripts suggest the presence of 160 genes. *Yeast* 6:383-401.
- Zaret, K. S., and F. Sherman. 1982. DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* 28:563-573.

関係論文

- Bun-ya, M., M. Nishimura, S. Harashima, and Y. Oshima. 1991. The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell. Biol.* 11:3229-3238.
- Bun-ya, M., S. Harashima, and Y. Oshima. 1992. Putative GTP-binding protein, Gtr1, associated with the function of Pho84 inorganic phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12: in press.
- Bun-ya, M., S. Nakade, S. Harashima, and Y. Oshima. Isolation and characterization of arsenate resistant mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. in preparation.
- Bun-ya, M., S. Nakade, S. Harashima, and Y. Oshima. Isolation and molecular characterization of suppressors of *pho84*, mutation of putative inorganic phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. in preparation.